



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Ciències

**Memòria del Projecte Final de Llicenciatura Ciències
Ambientals.**

**ESTUDI DE L'IMPACTE ECOTOXICOLÒGIC DE
L'INSECTICIDA IMIDACLOPRID EN DIFERENTS
COMPARTIMENTS AMBIENTALS**

Autora: Carla Ribalta Carrasco

Tutors: Xavier Domene Casadesus i M. Carme Riva Juan

Juny 2013

Agraïments

La realització d'aquest projecte no s'hagués pogut dur a terme sense l'ajuda proporcionada per moltes persones, en especial voldria agrair,

A la Dra. M. Carme Riva per donar-me la oportunitat de realitzar aquest treball a les instal·lacions del CRIT i fer-se càrrec dels costos d'aquest. Així com també a la Dra. Bettina Vallès i al Dr. Joan Ribó, ambdós integrants del centre, per ajudar-me en els dubtes que han sorgit al llarg de l'estudi.

Al Dr. Xavier Domene per acceptar ser-ne el tutor i per l'ajuda proporcionada en tot moment, ja que sempre que m'ha fet falta m'he l'ha proporcionat amb molta rapidesa i amb gran implicació. També gràcies per les idees proporcionades, els consells i les correccions.

Al Jaume Bori que ha estat la persona amb la que he compartit el dia a dia al laboratori i per tant molt probablement la persona a qui més li tinc que agrair els resultats d'aquest treball. Gràcies per tota l'ajuda que m'has donat, per estar en cada moment quan t'he necessitat independentment del dia de la setmana, per intentar respondre sempre tots els dubtes que he tingut que no han estat pocs, per ser un gran company i per fer la feina molt més agradable.

A la família i amics per l'interès i el suport que m'han donat en tot moment i la voluntat d'entendre la importància de l'estudi.

Per últim agrair també a totes aquelles persones que han passat per el centre durant aquest any i que m'han ajudat d'una manera o altra.

Índex

1. Introducció	11
1.1. Antecedents	11
1.2. La contaminació en el medi terrestre	11
1.3. La contaminació en el medi aquàtic	12
1.4. Avaluació del risc ecològic	13
1.4.1. Assajos d'ecotoxicitat.....	14
1.5. Objectius.....	15
2. Material i mètodes.....	17
2.1. Substància test	17
2.2. Manteniment cultius	17
2.2.1. <i>Eisenia fetida</i>	17
2.2.2. <i>Daphnia magna</i>	17
2.2.3. <i>Selenastrum capricornutum</i>	18
2.4. Efectes en el medi terrestre	19
2.4.1. Obtenció i caracterització del sòl per als assajos.	19
2.4.2. Efectes letals	19
2.4.2.1. Assaig de toxicitat aguda amb <i>Eisenia fetida</i>	19
2.4.3. Efectes subletals.....	20
2.4.3.1. Assaig d'evitament amb <i>Eisenia fetida</i>	20
2.4.3.2. Assaig de toxicitat crònica amb <i>Eisenia fetida</i>	21
2.4.3.3. Biomarcadors (Activitat AChE)	22
2.5. Efectes en el medi aquàtic	24
2.5.1. Obtenció i caracterització dels lixiviats.....	24
2.5.2. Efectes letals	24
2.5.2.1. Assaig de toxicitat aguda amb <i>Daphnia magna</i>	24
2.5.3. Efectes subletals.....	25
2.5.3.1. Assaig de reproducció amb <i>Daphnia magna</i>	25
2.5.3.2. Assajos de toxicitat amb <i>Selenastrum capricornutum</i>	25
2.6. Anàlisi estadística	27

3. Resultats	29
3.1. Medi Terrestre	29
3.1.1. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda amb <i>Eisenia fetida</i>).....	29
3.1.2. Efectes subletals.....	30
3.1.2.1. Efectes comportamentals (Assaig d'evitament amb <i>E.fetida</i>)....	30
3.1.2.2. Efectes en la reproducció (Assaig de toxicitat crònica amb <i>E.fetida</i>).....	31
3.1.2.3. Efectes en el pes (Assaig de toxicitat crònica)	31
3.1.2.4. Biomarcadors (Activitat AChE)	32
3.2. Medi Aquàtic	34
3.2.1. Lixiviació	34
3.2.2. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda <i>Daphnia magna</i>)	35
3.2.3. Efectes subletals.....	35
3.2.3.1. Assaig de toxicitat crònica <i>Daphnia magna</i>	35
3.2.3.2. Assaig d'inhibició del creixement de <i>Selenastrum capricornutum</i>	38
4. Discussió.....	40
4.1. Medi Terrestre	40
4.1.1. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda <i>Eisenia fetida</i>).....	40
4.1.2. Efectes subletals.....	40
4.1.2.1. Efectes comportamentals (Assaig d'evitament)	40
4.1.2.2. Efectes en la reproducció (assaig de toxicitat crònica <i>Eisenia fetida</i>).....	41
4.1.2.3. Efectes en el pes (assaig de toxicitat crònica <i>Eisenia fetida</i>)	41
4.1.2.4. Activitat AchE (biomarcador)	41
4.2. Medi Aquàtic	42
4.2.1. Lixiviació	42
4.2.2. Efectes letals (assaig de toxicitat aguda <i>Daphnia magna</i>)	42
4.2.3. Efectes subletals.....	42
4.2.3.1. Assaig de toxicitat crònica <i>Daphnia magna</i>	42
4.2.3.2. Assaig d'inhibició creixement <i>Selenastrum capricornutum</i>	42
5. Conclusions	44
6. Bibliografia	46
7. Acrònims i Paraules Clau	51

8. Pressupost	53
9. Programació.....	57
10. Annex.....	59

1. Introducció

1.1. Antecedents

La contaminació del medi es troba íntimament lligada a l'evolució que ha experimentat l'ésser humà en els últims 500 anys ja que les activitats humanes canvien l'entorn natural com a resultat de l'activitat econòmica (McNeill, 2001). A partir del s. XVI i especialment des de 1820 fins a l'actualitat l'ésser humà ha desenvolupat una sèrie d'avenços tecnològics i científics en l'àmbit del transport, l'agricultura o la indústria, fets que sens dubte han influït en l'estat actual del medi ambient. Així doncs, avui en dia s'està fent visible el cost mediambiental que ha suposat la consolidació de l'actual model de consum. Alguns autors han anomenat a aquest fet crisi ambiental "civilitzatòria" (Boada i Zahonero, 1998), ja que els efectes ambientals generats pel desenvolupament i el creixement socio-econòmic afecten tant a l'ésser humà com a la resta del planeta.

Un dels molts problemes ambientals és l'ús massiu de pesticides, el qual ha crescut enormement des del s.XIX i especialment a partir dels anys 1950 degut als canvis en el model de producció necessaris per abastir una població humana creixent (McNeill, 2001). Els plaguicides van suposar una gran solució a la fam i a les malalties i s'estima que un 30% de l'augment de la productivitat dels conreus es deguda exclusivament al seu ús (Olivera i Rodriguez, 1999)

Tot i l'evidència d'aquests efectes positius no s'ha d'oblidar que són substàncies químiques que tot i estar dissenyades per afectar específicament les plagues, tenen potencials efectes per a organismes no diana, podent afectar tant els ecosistemes adjacents a les zones agrícoles com als humans. Altres problemes derivats de l'ús massiu de pesticides és la generació de soques resistents, fent necessari un augment de les dosis d'aplicació i/o la necessitat de buscar nous pesticides. A més, la mobilitat d'alguns d'ells entre els diferents compartiments ambientals (aigua-aire-sòl) i la seva persistència en el medi poden agreujar aquests problemes. Finalment, per a molts pesticides, i malgrat els requeriments legals de descartar els seus riscos directes per l'ambient i l'home, es desconeixen els seus efectes additius amb altres substàncies o a llarg termini .

1.2. La contaminació en el medi terrestre

Segons la Comissió Europea la contaminació representa una de les principals amenaces per als sòls europeus (EEA, 2002). El sòl és un dels compartiments ambientals en què la humanitat ha influït de manera més determinant, degradant-lo o enriquint-lo segons la seva necessitat, de manera que alguns sòls han perdut qualsevol capacitat de producció mentre que altres s'han acondicionat per generar una gran quantitat de productes (McNeill, 2001). Malgrat les grans pressions a les que està sotmès, el sòl és el compartiment

ambiental menys protegit. Actualment els principals òrgans que en promouen la seva protecció a nivell europeu són la FAO i la Unió Europea amb la creació d'una proposta de directiva de protecció del sòl (actualment estratègia temàtica). A nivell de l'aprovació de comercialització de substàncies químiques a la UE cal destacar la normativa REACH, reglament europeu que regula el registre, avaluació i autorització de substàncies i barreges químiques amb l'objectiu de protegir les persones i el medi ambient.

La contaminació als sòls generalment es divideix en dos tipus, l'anomenada contaminació local (en que les fonts són puntuals i ben definides) i la contaminació difusa (on les fonts són difuses o poc definides). La contaminació local generalment s'associa amb la mineria, instal·lacions industrials i abocadors de residus. Els principals contaminants associats a aquest tipus de contaminació són productes químics industrials i residus urbans. Aquestes activitats no només representen un risc per al sòl, sinó que també el poden representar per a l'aigua a través de la lixiviació i la posterior contaminació de les aigües subterrànies i/o superficials. La contaminació difusa pot tenir els seus orígens en la deposició atmosfèrica, les pràctiques agrícoles inadequades o el reciclatge i tractament de residus i aigües residuals.

L'aplicació de pesticides al sòl pot comportar una contaminació irreversible d'aquest medi eliminant així formes de vida essencials i produint-ne la seva degradació, ja que els cicles naturals del nitrogen, la matèria orgànica... es veuen afectats (Olivera i Rodriguez, 1999).

Degut a males pràctiques agrícoles es pot produir l'acumulació en el sòl de contaminants presents en els seus productes com ara pesticides, podent-se aquests lixiviar a aigües subterrànies, passar a aigües superficials per escorrentia o evaporar-se passant a l'aire. Alhora, la contaminació pot entrar a la cadena tròfica directament via el cultiu o el bestiar alimentat pels productes agrícoles.

1.3. La contaminació en el medi aquàtic

Amb el creixement de la població i les tendències modernes l'aigua ha passat de ser usada exclusivament per al consum a ser utilitzada per obtenir energia, regar cultius, neteja, etc. Tota aquesta sèrie d'usos, la falta de consciència, i el coneixement de la seva capacitat de dilució han acabat per contaminar-la i convertir-la en destí final de la contaminació resultant de l'activitat humana (McNeill, 2001).

L'agricultura és una de les activitats que consumeix més quantitat d'aigua. Segons la FAO, un 70% del subministrament d'aigua superficial és consumit per l'agricultura i per tant aquest ús és el principal causant de la degradació dels recursos hídrics.

En la contaminació dels recursos hídrics es distingeixen dos tipus de fonts, les anomenades localitzades i les no localitzades. Les fonts localitzades estan associades a aquelles activitats en les quals l'aigua residual va a parar directament a les masses d'aigua receptores. Aquest tipus d'abocaments són fàcils de quantificar i controlar. Les fonts no localitzades són el resultat d'un ampli grup d'activitats humanes en les quals no hi ha un punt emissor determinat, com és el cas de les pràctiques agrícoles.

La contaminació dels cursos hídrics es produeix de forma directa per l'aplicació de pesticides en les aigües (arrossars), pel rentat d'envasos o equips i per descàrrega de residus. És també molt important la contribució indirecta produïda per la lixiviació (infiltració) i escorrentia superficial de productes que contaminen aigües subterrànies, zones humides, rius, llacs i fins i tot oceans (Olivera i Rodriguez, 1999).

Existeix una relació entre la contaminació dels sòls i la de les aigües, ja que els contaminants poden passar al compartiment aquàtic per processos com la lixiviació a aigües subterrànies o l'escorrentia superficial cap a aigües superficials, podent ser transportats a gran distància.

1.4. Avaluació del risc ecològic

La gran dispersió dels contaminants i la falta de coneixement sobre ells ha fet incrementar la preocupació sobre la presència de substàncies químiques en el medi ambient i, com a resposta, s'han desenvolupat metodologies d'avaluació de riscos basades en la formulació dels problemes i l'anàlisi i caracterització del risc.

Tradicionalment, per a la determinació de la qualitat dels diferents compartiments ambientals s'han utilitzat mètodes d'anàlisi químics que permeten determinar el tipus de compostos i la concentració en que es troben. Tot i això, aquests mètodes presenten importants limitacions com ara la necessitat d'equips i mètodes sofisticats, la necessitat de sobrepassar un llindar mínim per a la seva detecció o la gran dificultat en detectar tots els contaminants presents en una mescla. Finalment, en molts casos la seva presència no ens n'assegura la biodisponibilitat .

Degut als inconvenients dels mètodes químics citats anteriorment s'han desenvolupat mètodes alternatius basats en l'estudi dels efectes d'aquestes substàncies com és el cas dels assaigs biològics emprats en ecotoxicologia, una branca de la toxicologia que estudia els efectes tòxics de les substàncies químiques sobre els organismes vius a través de la realització d'assajos d'ecotoxicitat. L'avaluació del risc ecològic es fa en base al grup biològic que es pretén protegir, com són els organismes del sòl, els organismes aquàtics o els vertebrats terrestres.

1.4.1. Assajos d'ecotoxicitat

Els assajos d'ecotoxicitat es poden subdividir al llarg d'un gradient que va des de proves bàsiques de laboratori a nivell subindividual (biomarcadors) o individual (reproducció, creixement, comportament, etc) fins a experiments de camp de major complexitat a nivell de població, comunitat o ecosistema.

Els assajos ecotoxicològics basats en biomarcadors han esdevingut durant les últimes dècades un sistema complementari als assajos d'ecotoxicitat per a la determinació dels efectes dels contaminants en el medi. Es poden definir com a canvis mesurables a nivell subindividual (moleculars, bioquímics, fisiològics o histològics) que estan relacionats amb l'exposició a la contaminació. Poden classificar-se en biomarcadors d'efecte, d'exposició i de susceptibilitat. Depledge and Fossi (1994) proposaren l'ús de biomarcadors en assajos de toxicitat en un intent de relacionar les respostes dels biomarcadors amb els efectes observats durant l'assaig.

En aquest estudi s'ha seleccionat l'enzim acetilcolinesterasa com a biomarcador d'efecte ja que és un dels biomarcadors més utilitzats degut a la seva baixa especificitat, la qual el fa adient per a testar diferents tòxics que acaben bloquejant-lo. En el cas de l'insecticida testat en aquest estudi, tot i no bloquejar directament l'enzim, bloqueja els receptors de la acetilcolina de manera que s'espera observar possibles efectes indirectes.

Els assajos d'ecotoxicitat a nivell d'individu són proves de laboratori que permeten l'avaluació del risc de diferents productes químics ja sigui isoladament o en mescla, vers un organisme d'assaig en particular (Ecobichon, 1992). La base per a la seva realització és la relació progressiva i mesurable que s'espera trobar entre la dosi i l'efecte a nivell d'individu en les condicions de l'assaig. Els assajos es poden dividir segons termes d'exposició (aguda o crònica), efecte observat (mortalitat, reducció del creixement, efectes en la reproducció) o resposta efectiva (letal o subletal) en espècies concretes que són considerades representatives d'un determinat grup ecològic.

Els assajos de toxicitat aguda permeten observar efectes de mortalitat a un temps d'exposició més o menys curt segons l'organisme estudiat. Els assajos de toxicitat crònica en canvi permeten observar efectes a temps d'exposició més llargs (al voltant d'un mes). Alguns efectes subletals són la disminució de la reproducció o la inhibició del creixement.

Un cas especial d'assaig a nivell individual són els assaigs d'evitament, basats en el comportament d'espècies animals i utilitzats com a eines de cribatge ràpid ja que permeten obtenir informació rellevant en 48 hores.

1.5. Objectius

En aquest estudi es pretén estudiar el risc ambiental que suposa per a organismes terrestres i aquàtics l'aplicació de l'insecticida Confidor 20SL (Bayer), el qual té imidacloprid com a principi actiu. El risc s'ha avaluat en una espècie test terrestre i dues aquàtiques: el lumbrícid *Eisenia fetidai* dues espècies d'aigua dolça, el cladòcer *Daphnia magna* i l'alga unicel·lular *Selenastrum capricornutum*. La selecció dels organismes respon al seu ampli ús en ecotoxicologia a la seva facilitat de manteniment i manipulació al laboratori i sobretot a l'existència de protocols metodològics estàndards que permeten la comparabilitat dels resultats obtinguts.

Així doncs, l'objectiu d'aquest projecte és determinar l'impacte que l'insecticida Confidor 20SL, pot representar sobre el medi tenint en compte els potencials efectes sobre el sòl, on s'aplica de forma directe, i el medi aquàtic, on hi va a parar de forma indirecte a partir de la lixiviació o l'escorrentia superficial. Per a poder complir l'objectiu s'utilitzaran assajos d'ecotoxicitat i l'avaluació de biomarcadors.

Els objectius específics són:

- 1) Determinar els possibles efectes negatius associats a les concentracions d'imidacloprid habitualment aplicades en agricultura.
- 2) Determinar el grau amb que l'imidacloprid pot passar del compartiment sòl als ecosistemes aquàtics adjacents i causar-hi un impacte.

2. Material i mètodes

2.1. Substància test

L'insecticida d'estudi correspon a la marca comercial Confidor 20SL (Bayer) i té com a principi actiu l'imidacloprid. L'imidacloprid pertany al grup dels compostos neonicotinoids i actúa bloquejant els receptors postsinàptics en el sistema nerviós central. Els organismes diana són principalment plagues de xucladors i és utilitzat arreu del món. A dia d'avui han descrit efectes tòxics en diferents organismes que no en són la diana però la principal controvèrsia amb l'ús d'aquest insecticida és que causa efectes greus en les abelles i es creu que juntament amb d'altres és el causant de la disminució de la població d'abelles dels últims anys. Per aquest motiu aquest mes de Maig de 2013 la Unió Europea ha decidit restringir el seu ús durant 2 anys.

2.2. Manteniment cultius

2.2.1. *Eisenia fetida*

Eisenia fetida és un cuc de terra (Lumbricidae:Oligochaeta) àmpliament utilitzat per a estudis ecotoxicològics. Els cucs utilitzats en aquest treball procedeixen de cultius sincronitzats del CRIT, mantinguts en una mescla de torba i fems de vaca en una proporció 1:1, a una temperatura de 20 ± 2 °C i amb un fotoperíode de 12 hores de llum i 12 hores de foscor. Han estat alimentats amb una pasta de pà i aigua un cop a la setmana.

Per als assajos es van utilitzar cucs adults provinents d'un cultiu sincronitzat de com a mínim dos mesos d'edat. Per als assajos de supervivència i reproducció es van seleccionar individus amb un pes d'entre 300 i 600 mg i clitel·lats, mentre que per a l'assaig d'evitament no era necessari que els cucs presentessin clitel·li. Abans de l'inici dels assajos els cucs van ser aclimatats com a mínim durant 24 hores en 3 kg de sòl control ajustat al 60% de la seva WHC.

2.2.2. *Daphnia magna*

Daphnia magna (Cladocera:Crustacea) és un cladòcer d'aigua dolça d'ampli ús en estudis de toxicitat aquàtica pel seu fàcil cultiu en condicions de laboratori i seva la facilitat de manipulació. Les dàfnies utilitzades en els experiments d'aquest estudi procedien dels cultius del CRIT. Tres cops per setmana es renovava el medi, enriquit amb un extracte de matèria orgànica, i s'afegia com a aliment un concentrat de *Chlorella vulgaris*. El medi utilitzat correspon a l'ASTM E729-96 (2007) de pH 7.8-8.0. Els cultius es mantenien a una temperatura de 20 ± 2 °C i amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 de foscor. Per als experiments no es van utilitzar dàfnies de més de 24 hores d'edat ni procedents de la primera posta.

2.2.3. *Selenastrum capricornutum*

Selenastrum capricornutum (Chlorophyceae:Sphaeropleales) és un alga unicel·lular d'aigua dolça utilitzada àmpliament en ecotoxicologia. Els cultius procedien del CRIT i eren mantinguts en condicions d'esterilitat a una temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ i amb il·luminació permanent d'aproximadament 4000-5000 lux. El medi de cultiu utilitzat correspon a la norma AFNOR T 90-304 (1982), amb un pH entre 6.9-7.2.

Cada setmana es realitzaren re-inoculacions dels cultius en medi nou per mantenir-los en l'estat òptim de creixement (exponencial) per a la realització de l'assaig.

2.3. Concentracions test

Les concentracions de producte utilitzades en tot l'estudi (excepte en l'assaig de toxicitat aguda amb *Eisenia fetida*) es representen a la **Taula 1**.

	D.A min	x2	D.A min x4 D.A max/2	D.A max	x2
L/ha	0.5	-	-	4	-
[mg IMI /Kg sòl]	0.13	0.26	0.5	1	2
[mg Confidor /Kg sòl]	0.78	1.56	3.1	6.20	12.4

Taula 1. Concentracions d'imidacloprod testades en els assaigs de toxicitat terrestre (excepte evitament) i aquàtica. D.A: Dosi d'aplicació.

Les concentracions van ser seleccionades en base a les dosis més habituals d'aplicació del producte segons les recomanacions del propi fabricant, ja que el que es pretenia era estudiar l'efecte que l'aplicació recomanada d'aquest producte té sobre organismes de diferents compartiment ambientals. Es van seleccionar la concentració mínima i màxima d'aplicació del producte i es varen relacionar entre si utilitzant un factor de 2 per a representar concentracions intermitges que puguin trobar-se en el medi ambient. Es va incloure també una concentració superior a la màxima recomanada ja que la considerem probable degut al mal ús i abús dels pesticides que es fa per part d'alguns dels usuaris.

Per a l'assaig de toxicitat aguda amb *Eisenia fetida* no es van utilitzar les mateixes concentracions degut a que la bibliografia consultada no els otorgava efectes letals i a que l'objectiu de l'assaig, a banda d'obtenir la concentració letal 50 (LC_{50}), era la d'actuar com a primer cribratge de la toxicitat del producte i determinar l'idoneïtat de les concentracions escollides per la resta d'assajos.

2.4. Efectes en el medi terrestre

2.4.1. Obtenció i caracterització del sòl per als assajos.

El sòl utilitzat per a la realització dels assajos amb *Eisenia fetida* era un sòl natural d'una zona boscosa de Terrassa i va ser caracteritzat per Applus Agroambiental S.A (Sidamón, Lleida) (**Taula 2**). Prèviament al seu ús en els assajos, va ser tamisat a una mida de 2mm i se'n va determinar la WHC i la humitat per a poder ajustar-la al 60% de la WHC (que equival aproximadament al 45% d'aigua). En el mostreig es va agafar tan sols mostra dels primers 20 cm del sòl.

	Resultat
Carboni orgànic (C)	6.24% s.m.s
Humitat 105°C	3.0%
pH ext. 1:2 CaCl₂	7.2
Materia orgànica (Walkley-Black)	10.74% s.m.s
Nitrogen total (Kjeldahl)	0.37% s.m.s
Relació carboni/nitrogen	16.9
Llim total 0.002<D <0.005mm	37.4%
Argila D<0.002	24.1%
N-NO₃	15 mg/kg s.m.s
Capacitat intercanvi catiònic	22.8 meq/100g s.m.s
Arena total 0.05 <D<2mm	38.5%
Classe textural	Franca

Taula 2. Resultats caracterització del sòl. Font: elaboració pròpia a partir dels resultats proporcionats per Applus Agroambiental S.A.

2.4.2. Efectes letals

2.4.2.1. Assaig de toxicitat aguda amb *Eisenia fetida*

L'assaig es va dur a terme basant-nos en la norma OECD 207 (1984) i la UNE-77304-1 (1999). L'objectiu era determinar el percentatge de mortalitat dels cucs en un sòl amb diferents concentracions d'insecticida després de 7 i 14 dies d'exposició. Els tests es van realitzar en recipients de plàstic de 1 a 2L de capacitat i de dimensions 22.5 x 14.7 x 5 cm.

Primer es va realitzar un assaig preliminar per obtenir una indicació aproximada de les concentracions que causaven un 100% de mortalitat i les que no. Els resultats obtinguts van ser útils per determinar el rang de concentracions de l'assaig final. Les concentracions utilitzades habitualment en l'assaig preliminar són 0.1, 1, 10, 100 i 1000 mg de producte/kg sòl sec. En el nostre cas la concentració de 1000 mg/kg no es va testar ja que segons la literatura existent a 100 mg/kg ja s'havia d'obtenir una mortalitat total. Un cop obtinguts els resultats de l'assaig preliminar, es va dur a terme un assaig definitiu utilitzant unes concentracions que ens van permetre realitzar una recta dosi/efecte, calcular la EC₅₀, la NOEC i la LOEC. Es va establir un factor geomètric de 1.3

entre la major concentració que no causava efecte i la menor que provocava el 100% de mortalitat.

Per cada concentració es van preparar 4 rèpliques juntament amb 4 rèpliques amb sòl control. A cada rèplica es posaven 750 g de sòl ajustats al 60% de la WHC. Es va preparar una solució mare de 1000 mg Confidor/L i amb aquesta es van realitzar les dilucions necessàries per cada concentració de l'assaig. Es va afegir al sòl el volum de dilució que calia per obtenir la concentració i la humitat desitjades, barrejant-se bé fins a obtenir una mescla homogènia que es va repartir en les 4 rèpliques corresponents. Per al control el procediment fou el mateix, però sense la substància test. A continuació s'afegien 10 cucs per recipient prèviament aclimatats. Finalment els recipients es van cobrir amb una tapa que permetia l'intercanvi gasós i es van mantenir a una temperatura i llum constants ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 400-800 lux). Els cucs no van ser alimentats durant l'assaig.

Al cap de 7 i 14 dies es va determinar la mortalitat. Es prenia tot el contingut de cada rèplica i s'abocava en una safata, permetent el recompte dels individus vius. A més es va observar la seva reacció vers a estímuls mecànics. S'anotaven tant els comportaments anòmals com els danys visibles. Als 7 dies els cucs morts es van eliminar i la resta es van retornar al recipient. També en aquest moment es va fer un control de la humitat i si calia es va afegir aigua per restablir-la fins al nivell ja indicat. Al final de l'assaig es va determinar la humitat en un dels recipients control, i el pH en un recipient per concentració per descartar canvis dràstics que haguessin pogut afectar els resultats del test.

2.4.3. Efectes subletals

2.4.3.1. Assaig d'evitament amb *Eisenia fetida*

L'assaig es va dur a terme basant-se en la norma ISO 17512-1 (2008). L'objectiu d'aquest assaig era determinar el percentatge d'evitament a les 48h dels cucs exposats a concentracions subletals de la substància d'estudi. Les concentracions seleccionades foren les esmentades al punt 2.3.

Els assajos es van realitzar en recipients de plàstic de 1 a 2L de capacitat i de mida 22.5 x 14.7 x 5 cm.

Es van preparar 5 rèpliques per cada concentració i cada rèplica era constituïda per dues seccions de 350 g de sòl cadascuna (pes sec), una amb sòl control i l'altra amb sòl test (sòl tractat amb el producte d'assaig). Addicionalment, es van preparar 5 recipients control que contenien sòl control en ambdues parts per tal d'excloure comportaments anòmals no atribuïbles a l'insecticida. Primer es va preparar tot el volum de sòl control, amb la humitat ajustada al 60% de la WHC i es va repartit en les rèpliques com s'ha descrit. Les dues seccions s'omplien amb l'ajut d'una làmina (separador). Per a la preparació del sòl test es va preparar una solució mare de 1000 mg Confidor/l i amb aquesta es van

fer les dilucions necessàries per cada concentració de l'assaig. Es va afegir al sòl el volum de les dilucions que calia per obtenir la concentració i la humitat desitjades (60% de la WHC) i a continuació es va barrejar fins a obtenir una mescla homogènia, que va ser aplicada a les seccions corresponents. A continuació s'afegien 10 cucs a cada un dels recipients, col·locant-los just a la separació de les dues seccions.

Finalment els recipients van ser coberts amb una tapa que permetés l'intercanvi gasós i es van mantenir a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i llum contínua de 400-800 lux. Durant l'assaig els cucs no van ser alimentats.

A les 48h es va determinar l'evitament agafant cada recipient i col·locant un altre cop el separador, buidant cada secció en una safata i fent un recompte dels cucs presents en cadascuna. En els casos en que un cuc estava al mig contava com a mig cuc per banda.

Al final de l'assaig es va determinar la humitat en un dels recipients control i el pH en una rèplica de cada concentració per descartar canvis dràstics que poguessin explicar els efectes observats. La taxa d'evitament es va determinar segons la fórmula:

$$\% \text{ Evitament} = \frac{(C - T)}{N} \times 100$$

on C és el nombre de cucs que hi ha al sòl control, T el nombre de cucs que hi ha al sòl Test i N el nombre total de cucs.

2.4.3.2. Assaig de toxicitat crònica amb *Eisenia fetida*

L'assaig es va dur a terme segons la norma OECD 222 (2004). L'objectiu era determinar els efectes en la reproducció de cucs exposats a un sòl contaminat. En aquests assaigs també es poden determinar efectes en la supervivència i altres efectes subletals com el creixement dels adults a 28 dies d'exposició.

Els assaigs es van realitzar en recipients de plàstic de 14.5 x 14.5 x 8.5 cm. Les concentracions seleccionades van ser les esmentades al punt 2.3.

Per cada concentració es van preparar 4 rèpliques juntament amb 4 controls. A cada rèplica es van afegir 500 g de sòl (pes sec). Es va preparar una solució mare de 1000 mg Confidor/l i amb aquesta es van preparar totes les dilucions necessàries per cada concentració de l'assaig. Es va afegir al sòl el volum de dilució que calia per obtenir la concentració i la humitat desitjades, a continuació es va barrejar fins a obtenir una mescla homogènia que es va repartir en els 4 recipients. Per al control el procediment fou el mateix però sense afegir la substància d'assaig. A continuació es van afegir 10 cucs per recipient, prèviament aclimatats com s'ha descrit. Finalment, els recipients es van cobrir amb una tapa que permetés l'intercanvi gasós, i es van mantenir a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i entre 400-800 lux constants.

L'assaig va tenir una durada total de 56 dies, els cucs eren alimentats dos cops per setmana amb 2 g de pà fins al dia 28. En aquest dia els cucs adults es van retirar i es va continuar incubant el sòl fins al dia 56 per tal de permetre l'emergència i creixement de la descendència. Del dia 28 al 56 els juvenils es van alimentar un cop per setmana amb 2 g de pà.

En el moment d'iniciar l'assaig es va anotar el pes de cada grup de cucs per recipient. Al cap de 28 dies se'n va determinar la mortalitat i els cucs van ser pesats de nou per poder determinar canvis de pes entre l'inici i el final de l'assaig. Als 56 dies es feu el recompte del nombre de cucs nascuts de la següent manera: es va abocar tot el contingut de cada rèplica en un vas de precipitats d'1l i aquest va ser introduït en un bany maria a 40°C. A continuació s'en va anar augmentant la temperatura fins a 60°C i al cap d'entre 20-30 minuts els juvenils emergien a la superfície i es podien comptar.

Aproximadament un cop a la setmana durant els 56 dies de durada de l'experiment es va fer un control de la d'humitat i si ha era necessari es restablia afegint-hi aigua.

2.4.3.3.Biomarcadors (Activitat AChE)

Preparació de l'assaig:

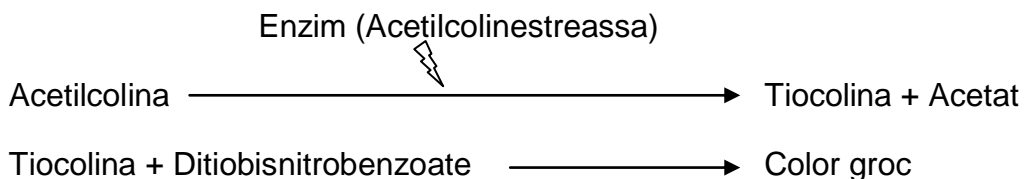
Per a l'avaluació dels efectes de la substància test en l'activitat de l'acetilcolina en *Eisenia fetida* es van exposar cucs a les diferents concentracions ja definides més un control. Es van preparar 3 rèpliques per concentració, cadascuna amb deu individus, en recipients, condicions ambientals i amb característiques dels cucs idèntiques a les descrites per a l'assaig de toxicitat crònica. També es va fer un seguiment de la humitat, i es va afegir aliment a partir del dia 14 dos cops per setmana en forma de 2 g de pà.

Per cada concentració, control inclòs, es van triar a l'atzar 3 cucs de cada rèplica al cap de 48 hores, 14 i 28 dies, coincidint amb els temps d'exposició de l'assaig d'allunyament, toxicitat aguda i toxicitat crònica respectivament. Els individus es rentaven bé amb aigua destil·lada, i se'ls col·locava en paper de filtre humit entre 2 i 4 hores per tal que buidessin el contingut intestinal. Seguidament es van netejar amb aigua destil·lada i es van congelar en tubs de plàstic a -20°C fins al moment de l'anàlisi.

Principi del mètode:

El mètode utilitzat permet determinar l'activitat de l'acetilcolinesterassa a partir d'extractes de teixits. La base d'aquest mètode és afegir una quantitat coneguda d'acetilcolina (en forma de Acetylthiocholine iodide 0.075M) a la mostra. Si l'enzim funciona correctament s'hidrolitzarà de manera que obtenim tiocolina i acetat. Afegint un substrat (Àcid Ditiobisnitrbenzoi 0.01M) que s'uneix a la tiocolina obtenim un nou producte de color groc i que és mesurable a

l'espectrofotòmetre de manera que podem relacionar el color groc amb la quantitat d'acetilcolina degradada.



Homogeneïtzació de la mostra:

Es van descongelar els tubs que contenien el cucs en un bany de gel, i es pesaren individualment. En els casos en que s'excedien els 300 mg de pes es va eliminar la part més allunyada del clitel. Es col·locava cada cuc en un eppendorf i s'afegia una relació 1:4 de búfer fosfat (PBS), consistent en una solució aquosa amb pH 7.4 que conté clorur de potassi, clorur de sodi, hidrogenfosfat de sodi dihidratat i fosfat de potassi monobasic.

A continuació es va homogeneïtzar la mostra i el búfer. L'homogenat es centrifugava 30 minuts a 10.000 rpm a una temperatura de 4°C i a continuació el sobrenedant es transferia a un nou eppendorf. En un altre eppendorf es va fer una dilució amb PBS 1:10 per tenir en total una dilució 1:40 respecte l'inici. Tots els passos es van fer en fred en un bany de gel per assegurar la integritat de l'enzim.

Determinació proteïna:

Previ a la determinació, es va realitzar una recta patró amb el sèrum d'albumina (BSA: sèrum d'albumina (Sigma-Aldrich)) com a font de proteïna, que permetia calcular la concentració de proteïna en la nostra mostra. Seguidament, per a cadascuna de les mostres (homogenat diluït) es va preparar un tub per a cada determinació a realitzar amb 3 ml de reactiu Bradford (Sigma-Aldrich) i 100 µl de la mostra. S'agitava i es deixava reposar entre 5 i 45 minuts abans de fer la lectura a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm.

Determinació activitat AChE:

REACTIU: 39.6 mg Àcid Ditiobisnitrobenzoi (DTNB) 0.01M (Sigma-Aldrich) + 15 mg bicarbonat sodic / 10 ml PBS.

SUBSTRAT: 21.67 mg Acetylthiocholine iodide 0.075 M (Sigma-Aldrich) / 1ml d'aigua ultra pura.

Es va preparar una cubeta per cada mostra amb 2.6 ml de búfer PBS a la qual s'afegiren 400 µl de mostra juntament amb 100 µl del reactiu. Es deixava reposar 2 minuts, es feia una mesura inicial a una longitud d'ona de 412 nm a l'espectrofotòmetre que s'utilitzava com a blanc, i a continuació s'afegien els 20 µl del substrat s'esperaven 10 minuts i es feia la lectura final.

2.5. Efectes en el medi aquàtic

2.5.1. Obtenció i caracterització dels lixiviats

Els assaigs de toxicitat aquàtica es van fer utilitzant lixiviats obtinguts de sòl contaminat amb el mateix rang de concentracions utilitzades en els assaigs de toxicitat terrestre.

Per a l'obtenció dels lixiviats es va seguir la norma UNE-EN 12457-2 (2003). Es va calcular la quantitat de sòl i de lixiviant (medi d'algues o dàfnia segons el cas) necessari per a obtenir el volum total de lixiviat previst a utilitzar en els assajos tenint en compte que la norma estableix que la relació líquid sòlid ha de ser de 10L – 1 kg sòl.

La quantitat adient de sòl es va contaminar amb la substància test pel mateix procediment dels assajos terrestres, afegint el volum de lixiviant necessari (medi d'algues o dàfnia) i agitant a la foscor durant 24 hores (el recipient es va cobrir amb paper d'alumini). Seguidament, es va deixar decantar entre 30 minuts i 2 hores i es va centrifugar 10 minuts a 4000 rpm. Finalment, per tal de separar restes vegetals flotant, es va filtrar amb paper de filtre. Els lixiviats obtinguts es van guardar al congelador fins al moment del seu ús.

Per a la realització dels lixiviats per fer l'assaig de toxicitat crònica en dàfnia calien aproximadament uns 8L per concentració, superant el màxim diari de 4L del laboratori, per la qual cosa els lixiviats de cada concentració es van realitzar en dos dies successius. Els lixiviats del primer dia es guardaven refrigerats i es van barrejar els del dia següent, tot seguit es van dividir en els diferents volums necessaris per a cada concentració test i es van guardar al congelador.

La concentració d'imidacloprid en els lixiviats es va determinar per HPLC al laboratori SAILab (Cerdanyola del Vallès, Barcelona).

2.5.2. Efectes letals

2.5.2.1. Assaig de toxicitat aguda amb *Daphnia magna*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OECD 202 (2004), que determina els efectes en la mortalitat pel cladòcer d'aigua dolça *Daphnia magna* de la substància testada. Les dàfnies eren directament exposades als diferents lixiviats obtinguts dels sòls. Per a cadascun dels 5 lixiviats es van preparar 4 rèpliques amb 5 dàfnies cadascuna, fent un total de 20 dàfnies per concentració d'assaig. Cada rèplica consistia en un tub de vidre amb 10 ml del lixiviat corresponent. Per evitar un efecte de dilució en afegir les dàfnies es va procedir de la següent manera: es seleccionaven les 20 dàfnies necessàries per a cada concentració i es posaven en un placa de petri amb una mica del lixiviat corresponent, des d'on es prenen els 5 individus per a cadascuna de les rèpliques. Els tubs es van tancar amb parafilm, prèvia comprovació que

contenien les 5 dàfnies, i es van mantenir en un incubador a 21°C i en fosc total. La supervivència es va determinar visualment a les 24 i 48 hores d'assaig. El pH i l'oxigen dels llixiviats es van mesurar inicialment i al final de l'assaig.

2.5.3. Efectes subletals

2.5.3.1. Assaig de reproducció amb *Daphnia magna*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OCDE 211 (2008), l'objectiu de la qual és determinar els efectes d'una substància sobre la reproducció de *Daphnia magna*. Els paràmetres que es poden analitzar són diversos, en el nostre cas han estat el nombre de nounats, el dia i la mida de la primera posta i el nombre de postes durant els 21 dies de durada de l'assaig.

Es van exposar les dàfnies directament als 5 llixiviats del sòl contaminat més el llixivat del sòl control sense contaminar. Per cada concentració es van preparar 10 rèpliques amb una sola dàfnia per cadascuna. Cada rèplica consistia en un got de 250 ml amb aproximadament 100 ml del llixivat corresponent. En començar l'assaig s'afegia com a aliment un concentrat de *Chlorella vulgaris* enriquit amb un extracte de matèria orgànica. El llixivat es renovava 3 cops per setmana durant l'assaig. Per a fer-ho, es retirava la dàfnia del got, s'eliminava el llixivat antic, i s'afegia el nou amb l'aliment i l'extracte i es tornava a introduir la dàfnia. Les rèpliques es van mantenir durant els 21 dies d'assaig en una cambra a una temperatura controlada de 20±2 °C i amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 de fosc. Es va controlar el pH i l'oxigen a l'inici i al final d'un dels canvis per descartar canvis abruptes que poguessin alterar els resultats. Les dàfnies eren observades diàriament per tal de registrar tots els paràmetres indicats.

2.5.3.2. Assajos de toxicitat amb *Selenastrum capricornutum*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OECD 201 (2011), que avalua la concentració que causa un 50% d'inhibició en el creixement d'algues dolces unicel·lulars a les 72 hores d'exposició. En aquest estudi es va avaluar l'efecte en la inhibició del creixement de *Selenastrum capricornutum* als diferents llixiviats en comparació amb un control (lixivat del sòl control sense contaminar) i un segon control realitzat amb medi de cultiu pur.

Per cada una de les concentracions es van preparar 3 rèpliques consistents en un tub, a cadascuna de les quals es van afegir 9 ml del llixivat i a continuació es va afegir 1 ml d'inòcul d'algues de concentració coneguda per saber quina era la concentració d'algues inicial en els tubs. Els tubs es tapaven amb cotó i duïen a la cambra de cultius, on eren col·locats en un agitador orbital a una temperatura de 20±2°C amb il·luminació continuada d'intensitat entre 4000-5000 lux. Tant el material com les condicions de treball eren d'esterilitat (excepte els llixiviats) fins al moment de dur els tubs a la zona d'assaig. Es van mesurar el pH dels llixiviats a l'inici i al final de l'assaig per descartar efectes

adversos en aquest paràmetre. Al cap de 72 hores es va realitzar la lectura de la concentració d'algues per cada una de les rèpliques mitjançant espectrofotometria a 665 nm. Els valors d'absorbància s'utilitzaven per estimar el nombre de cèl·lules algals/ml de mostra (X), en base a una recta patró determinada prèviament i que relacionava el nombre de cèl·lules/ml (determinades per recompte cel·lular directe amb microscopi) amb l'absorbància 665 nm. Per tal d'evitar interferències degudes al color del lixiviat, es va preparar un tub amb 9 ml de cada lixiviat 1 ml de medi (sense algues), els quals foren sotmesos a les mateixes condicions que la resta de l'assaig, així com la lectura d'absorbància a les 72 hores. Aquests valors d'absorbància van ser restats dels valors dels tubs d'assaig de lixiviats amb algues per poder tenir així l'increment d'absorbància exclusivament degut al creixement de les algues. A continuació es descriuen els paràmetres indicadors que es van calcular en base a la biomassa algal estimada en cadascuna de les mostres (X):

-Taxa de Creixement
$$\mu_{72h-0h} = \frac{\ln X_{72h} - \ln X_{0h}}{t_{72h} - t_{0h}}$$

on

μ_{72h-0h} = taxa de creixement específica en el període de 0-72h.

X_{72h} = concentració de biomassa al temps 72h (cèl·lules algals/ml)

X_{0h} = concentració de biomassa al temps 0h (cèl·lules algals/ml)

$t_{72h}-t_{0h} = t_{3d}-t_{0d}$ = diferencia entre el dia 3 d'assaig i el 0 (es a dir 3)

-Percentatge d'inhibició
$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

on

$\% I_r$ = el percentatge d'inhibició de la taxa de creixement específica

μ_C = valor mitjà de taxes de creixement (μ) dels controls

μ_T = valor de la taxa de creixement en cadascuna de les concentracions

-Inhibició del rendiment
$$\%I_y = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100$$

on

$\%I_y$ = percentatge d'inhibició del rendiment

Y_C = valor mitjà de la diferencia de la biomassa del control

Y_T =valor mitjà de la diferència de la biomassa per cada una de les concentracions

2.6.Anàlisi estadística

L'anàlisi de les dades es va realitzar amb els paquets estadístics SPSS, Minitab i Statistica. Les concentracions letals per al 50% dels individus (LC50) es van determinar per probit analysis (Statistica). Les concentracions efectives corresponents a la inhibició del 50% (EC50) es van calcular per regressió no-lineal (Statistica) mentre que els corresponents a l'evitament es va determinar per probit analysis (Minitab).

Les diferències en els paràmetres biològics letals i subletals de tots els organismes entre el controls i cadascuna de les concentracions de substància test, per tal d'estimar la LOEC i la NOEC es van realitzar amb el test post-hoc de Dunnet, mentre que l'evitament es va avaluar amb el test de Fisher.

3. Resultats

3.1. Medi Terrestre

3.1.1. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda amb *Eisenia fetida*)

La toxicitat aguda observada en *Eisenia fetida* es va utilitzar per a calcular la EC_{50} mitjançant l'anàlisi probit ajustat a un model logístic i utilitzant el programa Statistica (Figura 1 i 2 de l'Annex). L'anàlisi probit es va fer amb el valor mitjà de percentatge de supervivència de les quatre rèpliques de cada concentració test i la posterior transformació logarítmica de les concentracions a valors logarítmics (Taula 3 annex). Aquest càlculs es van realitzar tant en forma de concentració de l'insecticida Confidor® com de principi actiu (imidacloprid). En la **Taula 3** es poden observar els resultats de les LC_{50} calculades a partir del programa.

Concentració	LC50	Mínim (confiança 95%)	Màxim (confiança 95%)	R del model
mgConfidor/kg ss	24.71	23.30	26.20	0.997
mgIMI/kg ss	4.23	3.99	4.48	0.997

Taula 3. Toxicitat aguda (LC_{50}) per a *E. fetida* de la substància testada, expressada com a LC_{50} del producte comercial i del principi actiu (imidacloprid).

També es va calcular el percentatge de mortalitat (Taula 4 de l'Annex) i es va realitzar la següent recta (**Figura 1**). Amb la realització del test de Dunnett (Taula 5 de l'Annex) es van poder calcular els valors de NOEC i LOEC que són 15.21 i 19.77 mg Confidor/kg sòl respectivament.

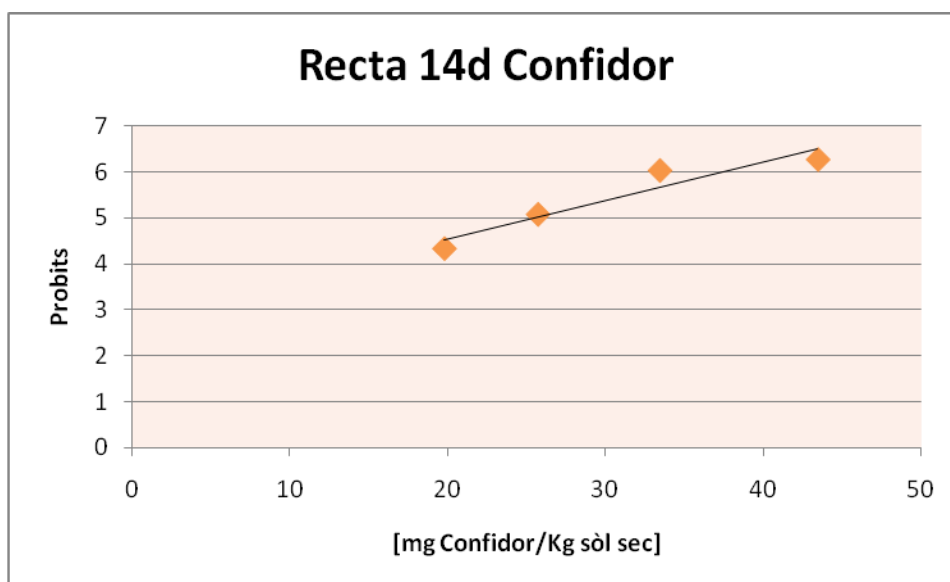


Figura 1. Toxicitat aguda de l'insecticida al rang de concentracions testades expressada com a probit.

Amb els resultats obtinguts es van poder establir relacions dosi-resposta molt bones que ens van permetre fer una bona estimació de la EC_{50} , NOEC i LOEC. Veiem que no hi ha efectes letals en les dosis d'aplicació. Tot i així cal destacar que la EC_{50} i els valors de NOEC i LOEC són molt propers al doble de la dosi màxima d'aplicació del producte.

3.1.2. Efectes subletals

3.1.2.1. Efectes comportamentals (Assaig d'evitament amb *E.fetida*)

Les variacions en el comportament d'evitament a les 48 h amb l'augment de la concentració d'insectida es representen en la **Figura 2**.

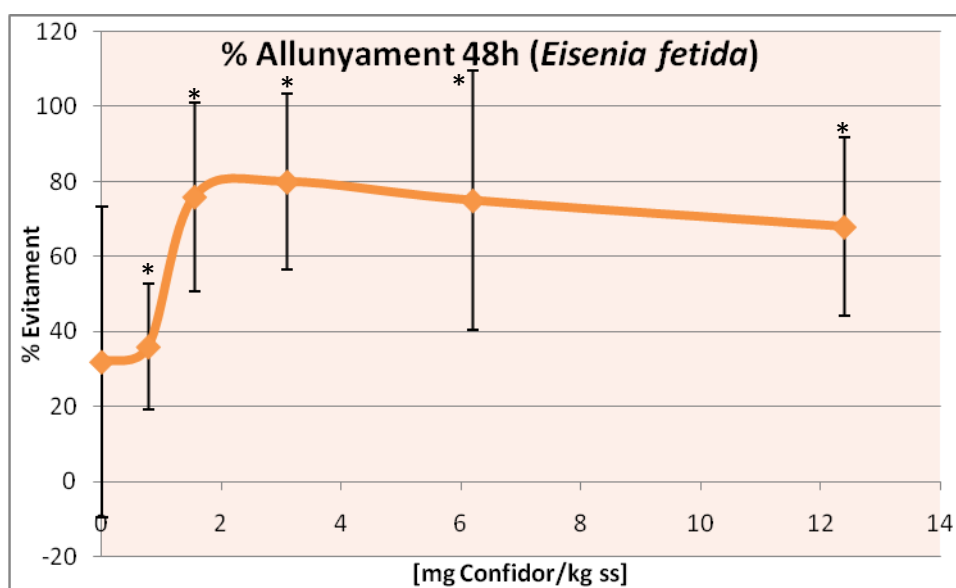


Figura 2. Comportament d'evitament de *E. fetida* a concentracions creixents de l'insecticida. Les concentracions marcades amb * presenten allunyament estadísticament significatiu segons el test de Fisher (veure resultats del test Taula 2 de l'Annex) acceptant H_0 (no hi ha allunyament/ n^o organismes que es queden al sòl contaminat) si $P \geq 0.005$.

Els resultats mostren un evitament estadísticament significatiu des de la primera de les concentracions utilitzades que correspon a la dosi d'aplicació mínima calculada. A partir d'aquesta concentració el % d'evitament augmenta ràpidament i a continuació s'observa una lleugera disminució.

El percentatge d'evitament, mitjançant anàlisi probit, ajustant amb una distribució logística i utilitzant el programa Minitab, ens va permetre calcular la EC_{50} així com la NOEC i LOEC per aquest paràmetre: $EC_{50} = 2.57$ (1.86, 3.21) mg Confidor/kg sòl, $EC_{50} = 0.43$ (0.31, 0.54) mg IMI/kg sòl, LOEC = 0.78 mg Confidor/kg i NOEC = entre 0 i 0.78 mg Confidor/kg.

3.1.2.2. Efectes en la reproducció (Assaig de toxicitat crònica amb *E.fetida*)

Amb els resultats obtinguts del número de descendents per concentració i rèplica es van calcular els promitjos i les desviacions per a cada concentració (Taula 6 de l'Annex). Aquests valors més el logaritme de la concentració van ser introduïts al programa estadístic Statistica utilitzant un model hormètic per a realitzar un anàlisi probit que ens va permetre obtenir el valor de $EC_{50} = 8.41$ (12.87, 5.38) mg Confidor/kg sòl o 1.40 (2.145, 0.897) mg IMI/kg sòl ($R^2 = 0.989$) (Figura 3 annex). Els resultats poden observar-se en la **Figura 3**.

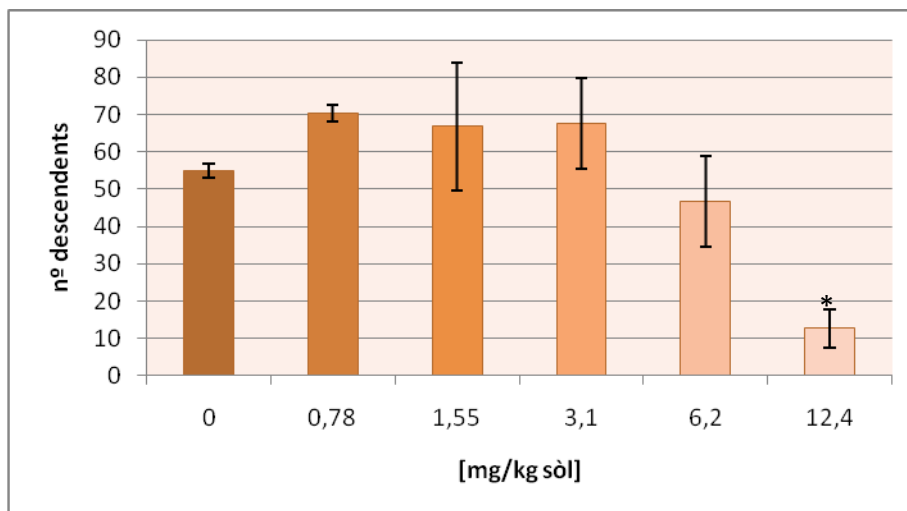


Figura 3. Nombre de juvenils d'*E. fetida* en les diferents concentracions test. L'asterisc indica diferències significatives respecte el control utilitzant el test estadístic de Dunnett (Taula 7 de l'Annex).

El valor de EC_{50} per al número de descendents està comprès entre la dosi màxima d'aplicació calculada i el doble d'aquesta. S'observa en les tres primeres concentracions un lleuger augment respecte el control en el número de descendents, i després comença a disminuir arribant a la concentració màxima on la disminució respecte el control és de gairebé el 80%.

3.1.2.3. Efectes en el pes (Assaig de toxicitat crònica)

Es van calcular les diferències de pes del total d'organismes per rèplica i concentració (Taula 8 de l'Annex) i es realitzaren els promitjos i les desviacions (Taula 9 de l'Annex). Amb els càlculs realitzats es va construir el següent gràfic (**Figura 4**).

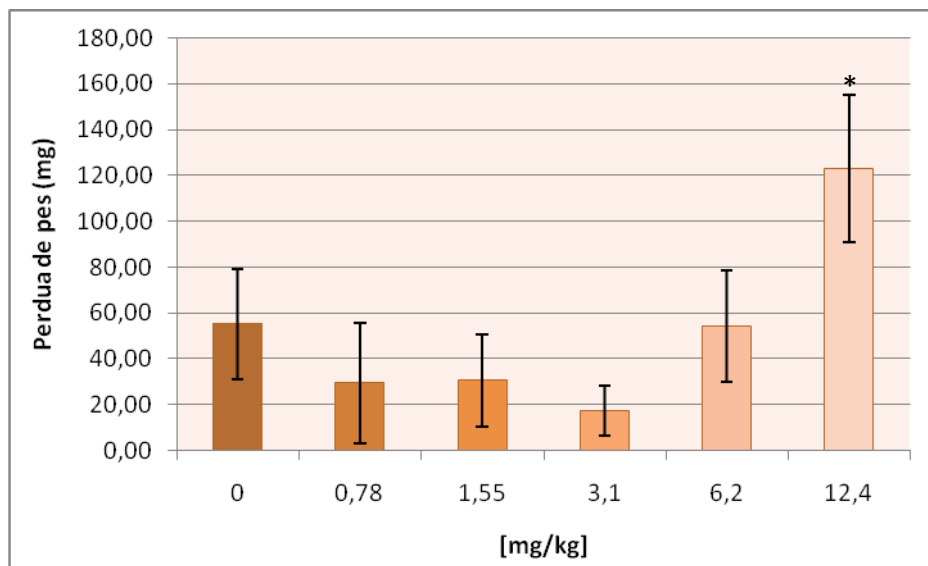
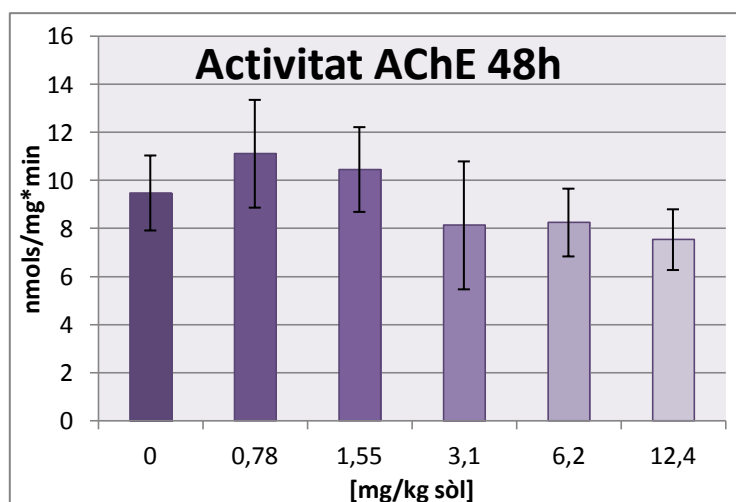


Figura 4. Pèrdua de pes d'*E.fetida* per les diferents concentracions testades. L'asterisc representa diferències estadísticament significatives respecte el control utilitzant el test de Dunnett (Taula 10 de l'annex).

La pèrdua de pes segueix una tendència molt similar a la del nombre de descendents però inversa. En les tres primeres concentracions els organismes perden inclús menys pes que en el control i en les dues últimes la pèrdua augmenta, especialment en la major de les concentracions en que la pèrdua de pes és més del doble que al control.

3.1.2.4. Biomarcadors (Activitat AChE)

Amb els resultats de les lectures d'absorbància realitzades en la determinació de la proteïna i l'activitat de l'enzim AChE es va calcular l'activitat en nmols/mg*min per cada rèplica de cada una de les concentracions (Taula 11 de l'Annex). Es varen realitzar els promitjos i les desviacions per a cada una de les concentracions i es realitzaren els següents gràfics que mostren els resultats obtinguts amb individus exposats durant 48 hores, 14 i 28 dies respectivament.



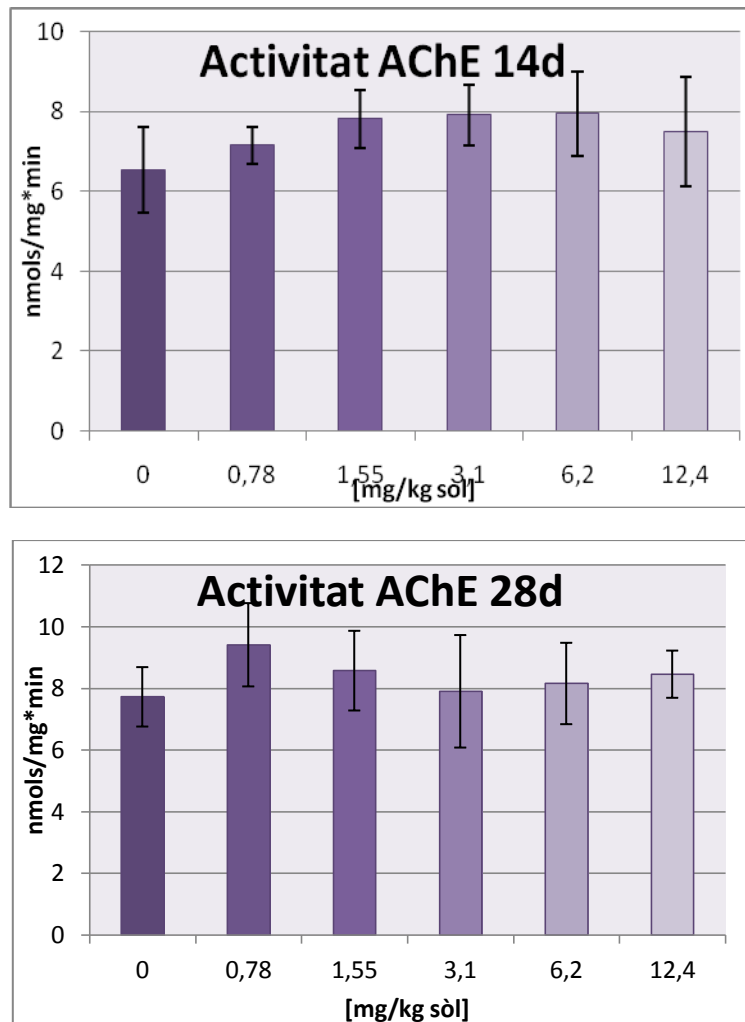


Figura 5, 6, 7. Activitat de l'enzim als 2, 14 i 28 dies d'exposició.

Els resultats obtinguts a les 48 hores mostren una lleugera disminució de l'activitat a mesura que augmenta la concentració sense ser estadísticament significatives (test de Dunnett Taula 12 de l'Annex). Contrastant amb aquests, els obtinguts a 14 dies mostren un lleuger augment amb l'increment de la concentració. Per últim els obtinguts als 28 dies no mostren cap tendència clara.

Es va realitzar un gràfic de la variació de la concentració de proteïna al llarg del temps i de les concentracions per complementar l'estudi de l'activitat de l'AChE.

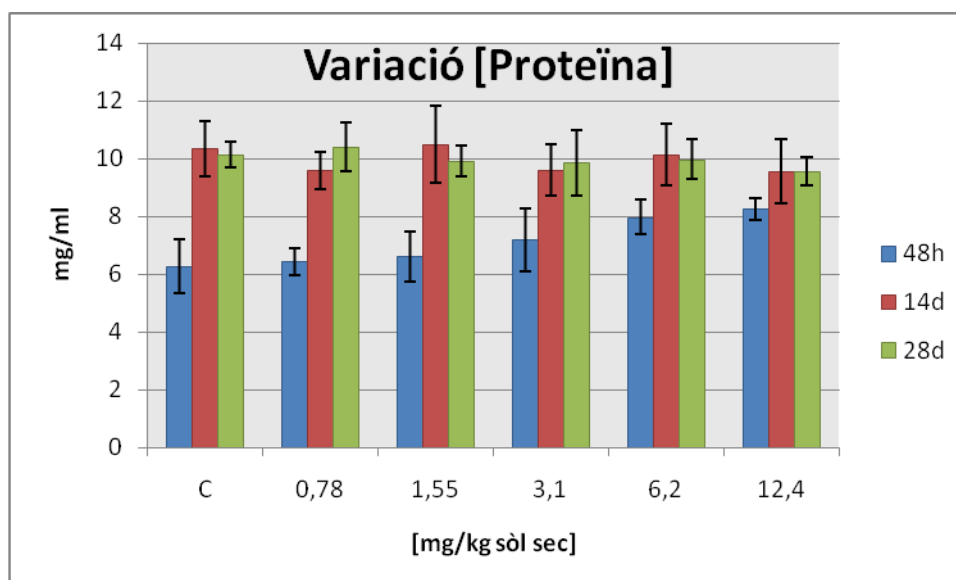


Figura 8. Valors de la concentració de proteïnes als 2, 14 i 28 dies.

A les 48 hores la concentració de proteïnes augmenta a mesura que augmentem la concentració de l'insecticida. Aquesta tendència però no és observada als 14 dies ni als 28 en que no s'obté cap resposta clara. Cal destacar també que per a totes les concentracions, la concentració de proteïna ens els cucs era major als 14 i 28 dies que a les 48 hores.

3.2. Medi Aquàtic

3.2.1. Lixiviació

Els lixiviats, realitzats amb el sòl contaminat a les concentracions escollides s'han dut a analitzar per HPLC al laboratori Sailab (**Taula 4**).

Lixiviats Algues		
Codi Mostra	[mg Confidor/kg sòl sec]	[µg IMI/kg lixiviat]
Mostra 1	0.78	< LC
Mostra 2	1.55	15.2
Mostra 3	3.1	< LC
Mostra 4	6.2	19.6
Mostra 5	12.4	71.8
Lixiviats Dàfnia Toxicitat aguda		
Codi Mostra	[mg Confidor/kg sòl sec]	[mg IMI/kg lixiviat]
Mostra 6	0.78	< LC
Mostra 7	1.55	10.9
Mostra 8	3.1	13.1
Mostra 9	6.2	21.8
Mostra 10	12.4	71.8
Lixiviats Dàfnia Toxicitat Crònica		
Codi Mostra	[mg Confidor/kg sòl sec]	[mg IMI/kg lixiviat]
Mostra 11	0.78	< LC
Mostra 12	1.55	< LC
Mostra 13	3.1	19.6

Mostra 14	6.2	34.8
Mostra 15	12.4	71.8
LC= Límit de quantificació= 1 µg/kg		

Taula 4. Resultats de l'anàlisi dels lixiviats obtinguts a partir del sòl contaminat. Font: elaboració pròpia a partir dels resultats obtinguts per SAllab.

3.2.2. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda *Daphnia magna*)

Amb els resultats de supervivència obtinguts per concentració i rèplica es van calcular els percentatges de supervivència amb la corresponent desviació (Taula 13 de l'Annex) i es va realitzar el següent gràfic (**Figura 9**).

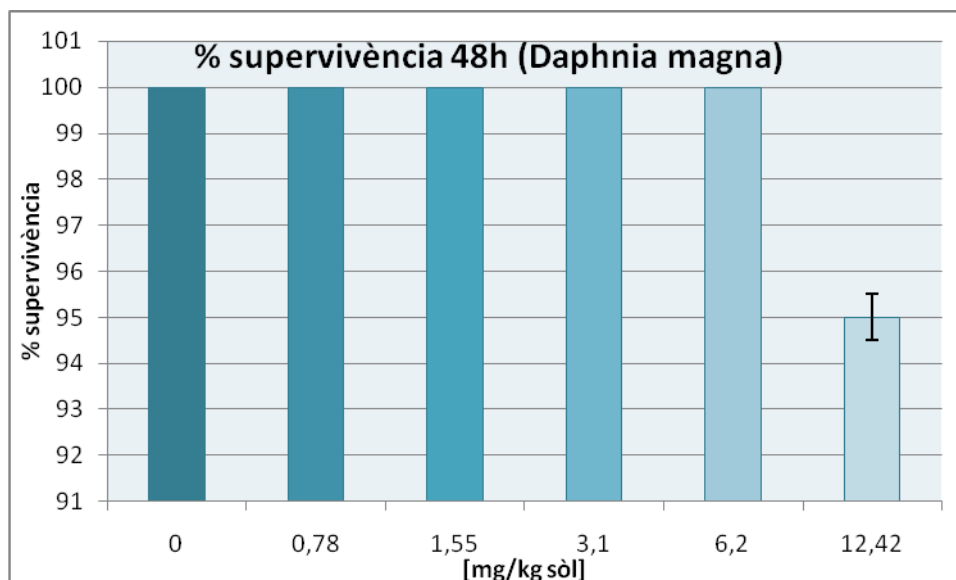


Figura 9. Percentatge de supervivència de les dàfnies a 48 hores d'exposició.

Amb els resultats obtinguts no va ser possible fer càlculs de EC_{50} . Els resultats que mostren un 100% de supervivència de les dàfnies exposades a totes les concentracions utilitzades excepte en la més elevada en que la supervivència es redueix al 95% i per tant no és significativa.

Posteriorment en la realització de l'assaig de toxicitat crònica amb *Daphnia magna*, que té una durada de 21 dies, el percentatge de supervivència observada en totes les concentració va ser del 100%.

3.2.3. Efectes subletals.

3.2.3.1. Assaig de toxicitat crònica *Daphnia magna*

L'assaig de toxicitat crònica amb *Daphnia magna* va ser utilitzat per obtenir resultats sobre diferents paràmetres que es poden veure afectats per l'efecte de l'insecticida com són el número de nounats, el dia i la mida de la primera posta i el número total de postes. En cap cas es van obtenir valors que ens permetessin l'obtenció de EC_{50} , NOEC i LOEC.

Es van anotar per a cada dàfnia el número de nounats diaris i el total produït i es va realitzar el promig i la desviació de les 10 dàfnies per rèplica (Taula 14 de l'Annex). Amb els resultats obtinguts es va construir el següent gràfic (**Figura 10**).

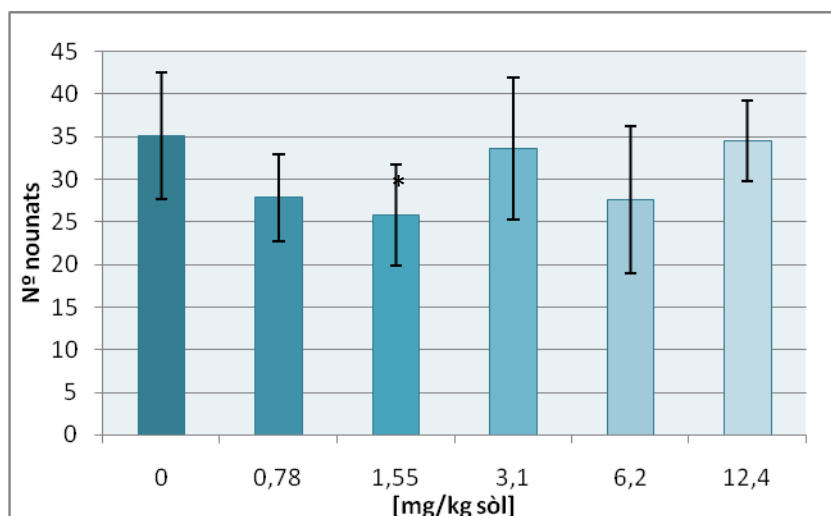


Figura 10. Número de nounats mitjà per dàfnia a 21 dies. L'asterisc representa diferències significatives utilitzant el test de Dunnett (Taula 15 de l'Annex).

Si comparem els valors obtinguts de les cinc concentracions assajades amb el control (lixiviats del sòl sense contaminar) no s'observa cap tendència clara que indiqui que el número de nounats disminueixi a mesura que augmentem la concentració. En algunes concentracions intermitges s'observa una disminució del número de nounats totals.

Per a cada dàfnia es va anotar el dia de la primera posta i la seva mida (Taules 16 i 17 de l'Annex). Amb els valors obtinguts es va realitzar el promig i la desviació per concentració i es varen elaborar els següents gràfics (**Figures 11 i 12**).

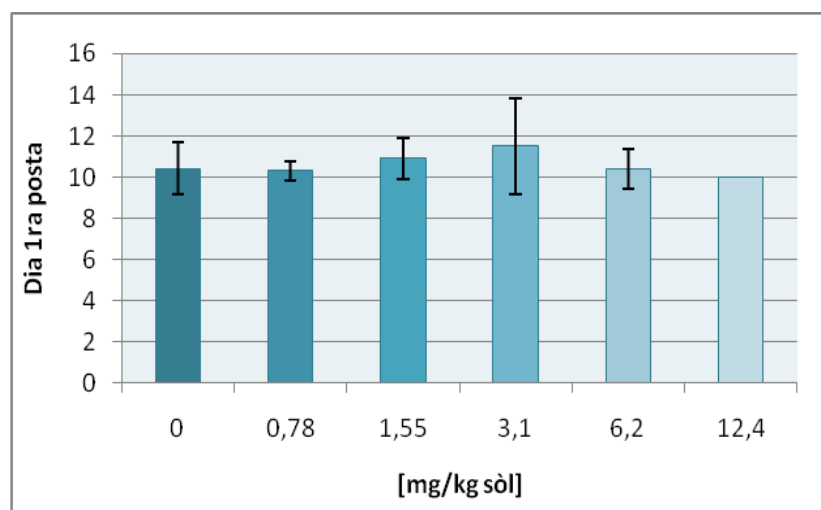


Figura 11. Mitja del dia de la primera posta per dàfnia.

En totes les concentracions la mitjana del dia de la primera posta és semblant. S'observa un lleuger augment fins a la concentració de 3.1 mg/kg sòl i a partir d'aquesta concentració torna a disminuir fins al valor del control.

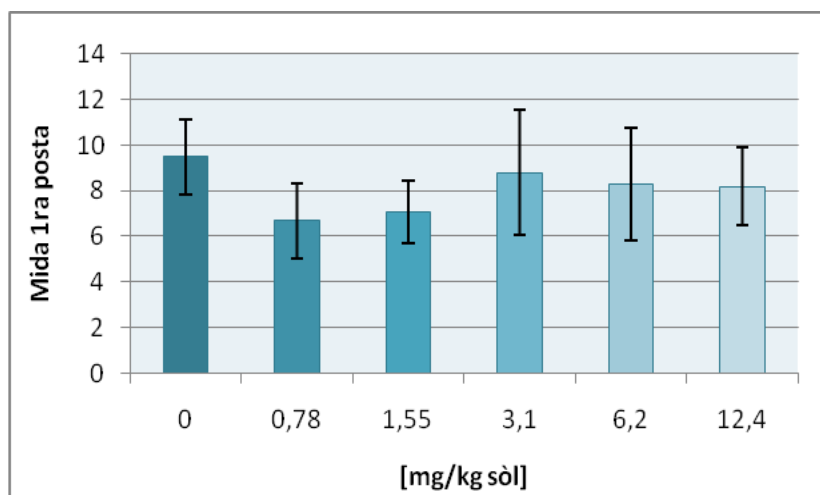


Figura 12. Mitja dela mida de la primera posta per dàfnia.

En totes les concentracions la mida de la primera posta es inferior a la del control. En la més baixa de les concentracions veiem la disminució més important i a partir d'aquí puja amb el seu màxim a la concentració de 3.1 mg/kg sòl i s'estabilitza. Si comparem el dia en que es fa la primera posta amb la mida d'aquesta veiem que, excepte en el cas del control, quan el dia de la primera posta augmenta també ho fa la mida d'aquesta.

Finalment es va elaborar un gràfic amb el promig i les desviacions calculades pel número de postes per cada concentració (Taula 18 de l'Annex) (Figura 13).

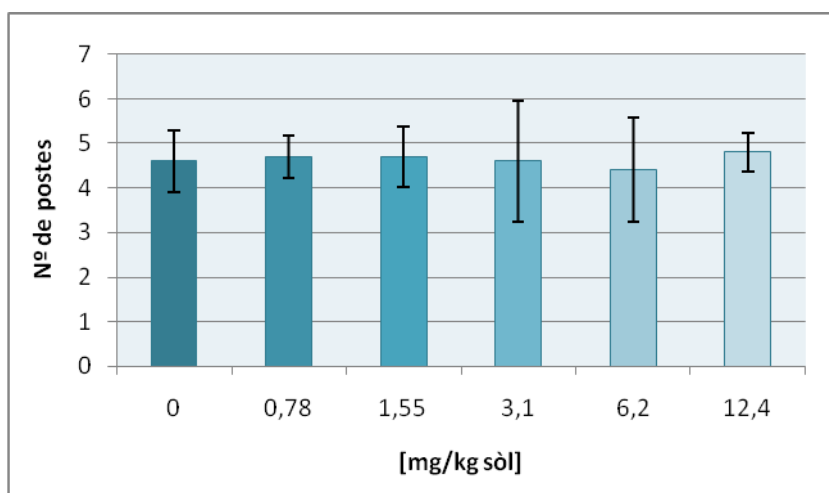


Figura 13. Mitja del número total de postes per dàfnia a 21 dies d'exposició.

La mitjana del número de postes és pràcticament estable a través de les diferents concentracions estudiades i no s'observen diferències.

3.2.3.2. Assaig d'inhibició del creixement de *Selenastrum capricornutum*

Per veure l'efecte de l'insecticida sobre el creixement de l'espècie d'alga utilitzada es varen calcular tres paràmetres per comparació del número d'algues inicials amb el creixement final observat. Els valors d'absorbàncies obtinguts van ser transformats a n^o cel/ml i amb aquests es varen realitzar els càlculs. Els resultats obtinguts no van permetre establir cap tipus de relació dosi-resposta, únicament es van fer els promitjos i les desviacions per a cada concentració utilitzant les diferents rèpliques i se'n va fer la següent representació (Figura 14).

Per la taxa de creixement es va realitzar el test estadístic de Dunnett a fi de veure si existien diferències significatives entre les concentracions i els control (medi de creixement d'algues i control del lixiviat del sòl).

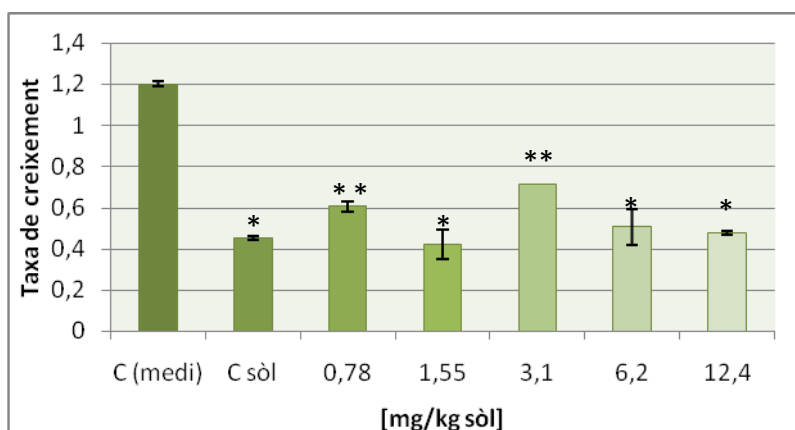


Figura 14. Taxa de creixement per a les diferents concentracions. Un asterisc representa diferències significatives respecte el control (medi), i dos asteriscs representen diferències respecte el C (medi) i el C sòl.

S'observen diferències significatives quan comparem tot els lixiviats estudiats amb el control (medi). Les taxes de creixement es redueixen pràcticament en tots a menys de la meitat. Quan comparem amb el control (lixiviat del sòl sense contaminar) observem diferències significatives a les concentracions de 0.78 i 3.1, que tenen taxes de creixements majors.

Per al percentatge d'inhibició i el rendiment no s'han inclòs les gràfiques ja que no aportaven més informació pel que respecta a la tendència. Els percentatges d'inhibició de tots els lixiviats varien entre el 40 i poc més del 60% sense seguir cap tendència a mesura que augmenta la concentració. En el cas del rendiment també veiem com hi ha una disminució respecte el control (medi) tot i que no és tant gran com en el cas de la taxa de creixement.

4. Discussió

4.1. Medi Terrestre

4.1.1. Efectes letals (Assaig de toxicitat aguda *Eisenia fetida*)

Segons els resultats obtinguts podem dir que en les dosis habituals d'ús no hi ha efectes de mortalitat per als cucs de terra. Tot i així, degut a la proximitat dels valors de EC_{50} , NOEC i LOEC, que són 24.71, 15.21 i 19.77 mg Confidor/kg respectivament, a les dosis màximes d'ús podem dir que la seva aplicació podria arribar a ser perillosa per a la supervivència dels organismes estudiats si no se'n fa un ús correcte. Els resultats obtinguts concorden molt bé amb els de Luo et al. (1999), on obtenen una LC_{50} als 14 dies de 2.30 mg IMI/kg sòl, valor molt pròxim a l' obtingut tenint en compte les diferències que hi pugui haver en la realització de l'experiment (condicions, tipus de sòl...). No succeeix el mateix amb els resultats obtingut per Alves (2012), en que s'obté una LC_{50} als 14 dies de 25.53 mg IMI/kg sòl, la qual difereix de la obtinguda. La reduïda toxicitat d'aquest insecticida en el darrer treball, que es redueix en un factor de 10, és en part deguda a què el sòl utilitzat té unes característiques i composició diferents, i també al fet que realitzen l'experiment en condicions ambientals tropicals, de manera que hi hauria pogut haver una important biodegradació de l'insecticida, ja que aquesta s'accelera amb la presència de matèria orgànica.

4.1.2. Efectes subletals

4.1.2.1. Efectes comportamentals (Assaig d'evitament)

Els resultats obtinguts comparats amb els obtinguts per Alves (2012) concorden força bé ja que també obtenen percentatges d'evitament a 48h amb *Eisenia fetida* estadísticament significatius en les mateixes concentracions que en les d'aquest estudi, tot i que en el seu cas els percentatges d'evitament són una mica superiors, amb la qual cosa la seva $EC_{50}=0.11$ mg IMI/kg és lleugerament inferior a la calculada per nosaltres $EC_{50}=0.43$ mg IMI/kg. Aquesta lleugera diferència pot ser deguda a que en el seu estudi s'utilitzen condicions ambientals tropicals i el sòl utilitzat és diferent. Per altra banda en el seu estudi no s'observa una reducció de l' evitament a les concentracions més altes, mentre que en el present estudi sí. Creiem que aquest efecte de disminució de l'allunyament pot ser degut a l'efecte en el sistema nerviós que produeix l'insecticida i que limita la capacitat de resposta dels organismes. Aquest resultat concorden amb els de Capoweiz (2003) en que observen una reducció estadísticament significativa de la longitud de les galeries formades per *Aporrectodea nocturna* i *Allolobophora icterica* i també de la distancia recorreguda a concentracions de 0.5 i 1 mg IMI/kg.

4.1.2.2. Efectes en la reproducció (assaig de toxicitat crònica *Eisenia fetida*)

Amb els resultats obtinguts podem dir que l'aplicació de l'insecticida no suposa una amenaça per a la reproducció d'*Eisenia fetida* quan l'insecticida és utilitzat en les dosis recomanades, però si a les més elevades que simulaven un ús poc responsable. El valor de EC₅₀ obtingut per als efectes en la reproducció que és de 8.41 mg Confidor/kg, és lleugerament inferior a l'obtingut per Alves et al. (2012) en que obtenen una EC₅₀ de 4.07 mg IML/kg, i Gomez-Eyles et al. (2009) amb una EC₅₀ de 3.23 mg IML/kg, molt similars tenint en compte les diferències en la realització de l'assaig.

L'explicació per a la reducció del número de descendents pot ser l'augment de malformacions de l'esperma estadísticament significatives a partir de 0.5 mg IML/kg trobades per Luo et al. (1999), i recolzades per l'aportació de Capoweiz and Berad (2006) que observen un reducció de la producció d'ous.

4.1.2.3. Efectes en el pes (assaig de toxicitat crònica *Eisenia fetida*)

Veiem alteracions del paràmetre en les dosis d'aplicació més altes en concordança amb el que succeïa amb el número de descendents. Altres autors han descrit una pèrdua de pes en aquesta espècie en condicions i concentracions similars (Alves et al. 2012, Dittbrenner et al. 2011). La reducció del pes pot ser deguda a la disminució de l'ingesta d'aliment (Dittbrenner et al. 2011). Aquesta hipòtesis quedaria confirmada per la reducció en la capacitat de moviment, ja comentada anteriorment, juntament amb la reducció de les excrecions que observen Dittbrenner et al (2011) en dosis similars aplicades a dues espècies de properes (*Lumbricus terrestris* i *Aporrectodea caliginosa*). Altres autors com Kreutzweiser et al. (2008) atribueixen la reducció de pes a canvis fisiològics, hipòtesi que es veu recolzada per Luo et al. (1999) que observaren una reducció en l'activitat de l'enzim cel·lulasa a baixes concentracions d'aquest insecticida.

4.1.2.4. Activitat AchE (biomarcador)

Els resultats obtinguts en la determinació de l'activitat de l'ACHé no permeten establir cap relació concentració/temps d'exposició i efecte. Això probablement es deu a que l'insecticida estudiat actua bloquejant els receptors de l'acetilcolina enlloc de l'enzim en si. En bloquejar-ne els receptors l'acetilcolina no es pot unir i transmetre la senyal, i per aquest motiu s'observen efectes visuals com la disminució de la longitud de les galeries i % d'evitament significatius a dosis baixes. Capoweiz et al. (2003) tampoc veu cap relació entre l'activitat de l'ACHé i l'augment de la concentració, però si que destaca l'augment estadísticament significatiu de les proteïnes el que fa pensar que si que hi ha una resposta general a l'insecticida. En el nostre cas aquest augment de la proteïna només s'observa a les 48 hores. Podem concloure que l'ús d'aquest biomarcador no és útil per a determinar l'efecte que produeix l'insecticida a nivell nerviós a *Eisenia fetida*. No obstant això Jemec et al.

(2007) si troben variacions importants en l'activitat de l'ChE en *Daphnia magna* exposades durant 21 dies a concentracions subletals o que causen només una lleugera mortalitat en els individus.

4.2. Medi Aquàtic

4.2.1. Lixiviació

Observant els resultats veiem que la transferència d'insecticida del sòl als diferents lixiviats preparats eren similar en els tres casos, sobretot a mesura que la concentració augmentava ja que ha concentracions baixes hi havia concentracions indetectables. Així doncs, podem dir que l'insecticida imidacloprid té certa capacitat de lixiviació o bé d'unir-se a partícules sòlides minerals o orgàniques i per tant amb capacitat de mobilitat entre ecosistemes terrestres i aquàtics. Alguns estudis anteriors consideraven que la capacitat de lixiviació de l'insecticida era relativament baixa degut a la immobilització del producte en el sòl (Mullins, 1993; Tomlin, 1997; Krhon and Hellpointer, 2002), mentre que altres indicaven el contrari (Felsot et al., 1998; Gonaes-Pradas et al., 1999; Armbrust and Peeler, 2002; Gupta e al., 2002).

4.2.2. Efectes letals (assaig de toxicitat aguda *Daphnia magna*)

Els resultats obtinguts són els esperats ja que les concentracions d'imidacloprid de tots els lixiviats assajats són molt menors a la EC_{50} estimada en l'estudi de Tisler et al. (2009) ($LC_{50(48\text{hores})} = 56.6 \text{ mgIMI/L}$; $NOEC_{21d} = 1.25 \text{ mg/L}$).

4.2.3. Efectes subletals

4.2.3.1. Assaig de toxicitat crònica *Daphnia magna*

Podríem dir que cap dels paràmetres analitzats en cap de les concentracions presentava diferències significatives respecte el control. Els resultats concorden amb els obtinguts per Jamec et al. (2007) en que va obtenir una LOEC d'entre 2.5 i 10 mg IMI/L segons el paràmetre estudiat dins els efectes en la reproducció. Aquests valors són molt superiors al mesurats en els lixiviats, per tant la lixiviació de l'insecticida en les dosis estudiades no suposaria cap perill per a aquest organisme.

4.2.3.2. Assaig d'inhibició creixement *Selenastrum capricornutum*

Tot i obtenir disminucions importants en la taxa de creixement, no podem dir que sigui deguda al pesticida. El que sí s'intueix és que el lixivat del sòl té un efecte negatiu sobre el creixement de les algues.

No es va observar cap efecte tòxic, com era esperat, ja que els valors obtinguts de EC_{50} per Tisler et al. (2009) ($EC_{50} = 389 \text{ mg IMI/L}$) i els de Malev et al. (2012), que troba una reducció significativa del creixement entre 127.8-255.6 mg/L utilitzant el mateix insecticida, són molt superiors a les concentracions dels lixiviats estudiats.

5. Conclusions

L'ús de l'insecticida Confidor 20SL en les dosis recomanades pel fabricant presenta un perill potencial per a *Eisenia fetida* ja que tot i no observar-se efectes letals s'observen efectes subletals greus, amb una EC50 per la reproducció molt propera a la dosi recomanada d'aplicació i respostes d'evitament de fins el 80% a dosis encara més baixes. Amb els resultats obtinguts podem dir que l'ús d'aquest insecticida pot influir en la presència d'espècies similars en els sòls, amb la conseqüent pèrdua de biodiversitat i la pèrdua de les funcions beneficioses realitzades per aquests organismes. Així doncs creiem que cal garantir-ne l'aplicació correcta i establir una regulació en el seu ús.

Pel que fa al risc de transferència de l'insecticida a ecosistemes aquàtics simulat amb la preparació de lixiviats a partir de sòl contaminat, la manca d'efectes nocius en els organismes aquàtics estudiats fa pensar que no hi hauria perill real en cap de les dosis estudiades.

El disseny de l'estudi realitzat ens ha permès aconseguir els objectius fixats inicialment. En base als resultats, tots els bioassajos seleccionats van ser adequats per a respondre les preguntes experimentals, excepte l'activitat de l'AChE, ja que no està directament afectada per l'insecticida.

Els resultats d'aquest treball suggereixen noves preguntes experimentals, com si és possible un efecte acumulatiu de les aplicacions reiterades de l'insecticida sobre el sòl, ja que tot i no ser tant persistent com altres pesticides, la seva durada en el sòl està estimada entre els 100 i 300 dies. També fer estudis d'ecotoxicitat amb altres organismes test amb protocols estàndard disponibles, com col·lèmbols i enquitreids o altres, per tal de valorar amb més rigor els riscos ambientals d'aquest insecticida i poder valorar la seva restricció o prohibició.

6. Bibliografia

AFNOR. Acute toxicity to aquatic plants. T 90-304. *Association Française de Normalisation. Switzerland (1982).*

Alves, P.R.L., Cardoso, E.J.B.N., Martines, A.M., Sousa, J.P., Pasini, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere (2012).*

Antunes, S., Pereira, J., Cachada, A., Duarte, A., Gonçalves, F., Sousa, J., Pereira, R. Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing. *Journal of Hazardous Materials 184 215-225 (2010).*

Armbrust, K.L., Peeler, H.B. Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf. *Pest Manag Sci 58:702-706 (2002).*

ASTM. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. E729-96a. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 20 pp (1996).*

Baylay, A.J., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Griffin, J.L., Swain, S.C., Sturzenbaum, S.R., Jones, O.A.H. A metabolomics based test of independent action and concentration addition using the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicology 21:1436-1447(2012).*

Boada, M., Gómez, F.J. Biodiversidad. (2008)

Booth, L.H., O'Halloran, K. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 20, No.11, pp.2494-2502, (2001).*

Capoweiz, Y and Berad, A. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicol. Environ Saf. 64(2), 198-206 (2006).*

Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L. Earthworm behaviour as a biomarker- a case study using imidacloprid. *Pedobiologia 47, 542-547, (2003).*

Dittbrenner, N., Moser, I., Triebkorn, R., Capoweiz, Y. Assessment of short and long-term effects of imidacloprid on the burrowing behaviour of two earthworm species (*Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris*) by using 2D and 3D post-exposure techniques. *Chemosphere 84 1349-1355 (2011).*

Dittbrenner, N., Schmitt, H., Capoweiz, Y., Triebkorn, R. Sensitivity of *Eisenia fetia* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. *J Soils Sediments* 11:1000-1010 (2011).

Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I., Capoweiz, Y. Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworms species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology* 19: 1567-1573 (2010).

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, Vol.7, pp 88-95(1961).

FAO. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. *Food and Agriculture Organization. Burlington* (1997).

Gambi, N., Pasteris, A., Fabbri, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145 678-685 (2007).

Gomez-Eyles, J.L., Svendsen, C., Lister, L., Martin, H., Hodson, M.E., Spurgeon, D.J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 71-79 (2009).

Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Kalpana, Agnihotri, N.P. Leaching Behavior of imidacloprid formulations in soil. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology* 68:502-508 (2002).

ISO Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. 17512-1 Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). *International Organization for Standardization* (2008)

Jemec, A., Tisler, T., Drobne, D., Sepcic, K., Fournier, D., Trebse, P. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere* 68:1408-1418 (2007).

Kreutzweiser, D., Good, K.P., Chartrand, D.T., Scarr, T.A., Holmes, S.B., Thompson, D.G. Effects on litter-dwelling earthworms and microbial decomposition of soil-applied imidacloprid for control of wood-boring insects. *Pest Manag Sci* 64: 112-118 (2008).

Loureiro, S., Ferreira, A.L.G., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A. Evaluation of the toxicity of two soils from Jales Mine (Portugal) using aquatic bioassays. *Chemosphere* 61 168-177 (2005).

Luo, Y., Zang, Y., Zhong, Y., Kong, Z. Toxicological study of two novel esticides on earthworm *Eisenia Foetida*. *Chemosphere*, Vol. 39, No. 13, pp. 2347-2356, (1999).

Malev, O., Klobucar, R.S., Fabbretti, E., Trebse, P. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2012).

McNeill, J.R. Algo nuevo bajo el sol. (2001)

Miranda, A.F.P., Rodrigues, J.M.L., Barata, C., Riva, C., Nugegoda, D., Soares, A.M.V.M. The use of *Daphnia magna* immobilization tests and soil microcosms to evaluate the toxicity of dredged sediments. *J Soils Sediments* 11:373-381 . (2011)

OECD 222 *Earthworm, reproduction Tests, Test No. 222. Organization for Economic Co-operation and Development* Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Publishing(2004).

OECD. *Daphnia magna* Reproduction Test. 211 *Organization for Economic Co-operation and Development* Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Publishing (2008).

OECD. *Daphnia* sp. Acute Immobilization test. 202. *Organization for Economic Co-operation and Development* Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Publishing(2004).

OECD. Freshwater Alga and Cyanobacteria, growth Inhibition Test. 201. *Organization for Economic Co-operation and Development Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Publishing* (2011).

OECD. *Earthworm, Acute Toxicity Tests, Test No. 207. Organization for Economic Co-operation and Development* Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Publishing(1984).

Olivera, S.B. i Rodriguez, D.I. Pesticidas, Salud y Ambiente. *Posdata* 259:80-82 (1999).

Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M. Biomarkers in Earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 165:117-159.

Thuyet, D.Q., Jorgenson, B.C., Wissel-Tyson, C., Watanabe, H., Young, T.M. Wash off of imidacloprid and fipronil from turf and concrete surfaces using simulated rainfall.

Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B., Trebse, P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76 907-914 . (2009)

UNE-EN. Calidad del suelo. Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 1: Determinación de la toxicidad aguda utilizando un sustrato de suelo artificial. 77304-1 AENOR (1999).

UNE-EN. Caracterización de residuos. Lixiviación. Ensayo de conformidad para la lixiviación de residuos granulares y lodos. Parte 2: Ensayo por lotes de una etapa con una relación líquido-sólido de 10 l/kg para materiales con un tamaño de partícula inferior a 4 mm (con o sin reducción de tamaño).12457-2. AENOR (2003).

Velki, M., Hackenberger, B.K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* (2012).

7. Acrònims i Paraules Clau

WHC: water holding capacity. Capacitat de retenció d'aigua d'un sòl

LC50: Concentració letal 50. Aquella concentració que causa la mort al 50% dels individus exposats.

EC50: Concentració efectiva 50. Aquella concentració que causa un 50% de l'efecte d'estudi.

LOEC: Lowest Observed Effect Concentration. La concentració més baixa que causa l'efecte d'estudi.

NOEC: No observed effect concentration. La concentració més alta que no causa cap efecte.

IMI: imidacloprid.

8. Pressupost

Concepte	Quantitat	Unitats	€/unitat	Total
Sou tutor	80	Hores	15	1200
Sou Doctorant	150	Hores	8	1200
Sou becari	630	Hores	5	3150
Desplaçaments	420	u	0.78	327.6
Material oficina	Impresions	4	15	60
	Enquadernacions	4	8	32
	Cd's	4	0.50	2
	Paper	1bloc	4.5	4.5
	Altres	2+1	5	5
Analisis lixiviats	15	U	70	1050
Analisis sòl	1	u	68.80	68.80

Reactiu	Quantitat	Unitats	Preu envàs	Preu unitat	Total
Nitrat de calci terhidratat	8	g	53.80/500g	0.1076	0.8608
Nitrat de potassi	20	g	67.20/500g	0.1344	2.688
Monohidrogenfosfat de sodi anhidre	8	g	48.90/100g	0.489	3.912
Sulfat de magnesi heptahidratat	85	g	30.70/500g	0.0614	5.219
Sulfat de coure	0.06	g	34.20/100g	0.342	0.02052
Heptamolibdat d'amoni terhidratat	0.120	g	59.80/100g	0.598	0.07176
Sulfat de zinc heptahidratat	0.120	g	18.30/100g	0.183	0.02196
Clorur de cobalt hexahidratat	0.120	g	138.00/100g	1.38	0.1656
Àcid bòric	0.120	g	26.50/10g	2.65	0.318
Àcid cítric	0.120	g	12.80/100g	0.128	0.01536
Citrat de ferro pentahidratat	3.30	g	36.20/250g	0.1448	0.47784
Sulfat de ferro heptahidratat	1.30	g	37.80/250g	0.1512	0.19656
Clorur de ferro hexahidratat	1.30	g	21/5g	4.2	5.46
Clorur de potassi	220	g	68.50/500g	0.137	30.14
Sulfat de calci dihidratat	40	g	44.40/500g	0.0888	3.552
Hidrogencarbonat de sodi	70	g	27.40/500g	0.0548	3.836
Clorur de sodi	10	g	32.20/250g	0.1288	1.288
Fosfat de potassi monobasic	2	g	184.50/25g	7.38	14.76
Reactiu Bradford	330	ml	87.20/500ml	0.1744	57.552
BSA: sèrum d'albúmina	10	g	87.50/10g	8.75	87.5
Àcid Ditiobisnitrobenzoi (DTNB)	0.0596	g	22.70/1g	22.70	1.35292
Acetylthiocholine iodide	0.1084	g	31.30/1g	31.30	3.39292

Confidor 20SL	1	u	20	20	20
----------------------	---	---	----	----	----

Material	Quantitat	Preu Unitat	Total
Recipients plàstic	62	0.35	21.7
Aquaris plàstic	6	2	12
Safates	6	38	228
Espàtules	2	7.28	14.56
Gots de vidre (150ml)	70	2.165	151.55
Tubs de vidre 20ml	100	0.16	16
Coto	1	13.70	13.70
Tubs centrifuga	50	0.605	30.25
Pipetes plàstic (10ml)	1	0.225	11.25
Erlenmeyers 500 ml	6	6.09	36.54
Erlenmeyers 250 ml	6	4.05	24.3
Gradeta	2	32	64
Pera succió	1	13.94	13.94
Ampolles vidre (1l)	10	20	200
Guants	1	15	15
ulleres	1	12	12
mascareta	1	1.24	1.24
Paper alumini	1	3	3
imans	10	0.673	6.73
Bosses plàstic	50	0.4	20

Aparell	Quantitat (dies us)	Cost aparell	Total
Campana	10	1800	4.93
Autoclau	15	10000	41.10
Agitadors	45	1800	22.20
Espectrofotòmetre	15	7000	28.80
Microscopi	5	2000	2.80
Centrifuga eppendorfs	2	3500	2
Centrifuga	30	5500	45.20
Nevera	80	350	7.70
Congelador	20	800	4.40
Balança precisió	14	5000	19.20
Balança	18	600	3
Estufa	15	2000	8.22
Homogeneïtzador	2	1700	1
Aigua destil·lada +	140	6000	230.15

up			
Maquina gel	12	4000	13.15
Micropipeta 5ml	15	140	0.60
Micropipeta 1ml	15	140	0.60
Microp. 100 microl	8	140	0.31
Micropipeta 20 microl	8	140	0.31

TOTAL: 9144 €

9. Programació

	Setembre	Octubre	Novembre	Desembre	Gener	Febrer	Març	Abril	Maig	Juny	Juliol
Contacte tutor	X										
Recerca bibliogràfica	X	X									
Disseny experimental		X	X								
Fase experimental				X	X	X	X	X	X		
Anàlisi dels resultats						X	X	X	X		
Elaboració de la Memòria del PFC							X	X	X	X	
Defensa del projecte											X

10. Annex

Taula1. Percentatge d'evitament a les 48 hores (*Eisenia fetida*).

[mg Confidor/kg ss]	C	0,78	1,55	3,1	6,2	12,4
Rèplica	40	60	70	70	80	50
Rèplica	20	20	70	80	0	80
Rèplica	0	40	100	30	60	100
Rèplica	0	20	40	90	80	70
Rèplica	100	40	100	80	80	40
Promig	32	36	76	70	60	68
Promig corregit	32	36	76	80	75	68
Desviació	41,47288	16,7332	25,0998	23,45208	34,64102	23,87467

Taula 2. Resultats del test de Fisher.

[mg/kg]	Resposta	p-valor	Avoidance
0	29/21	0,099294	NO
0,78	16	0,001317	SI
1,55	6	0	SI
3,1	7,5	0	SI
6,2	14	0,000184	SI
12,4	8	0	SI

Taula 3. Resultats de supervivència a 14 dies (*Eisenia fetida*).

[mg Confidor/Kg sòl sec]	log conc.	[mg IMI/Kg sòl sec]	log conc.2	R1	R2	R3	R4	Promig	% supervivència
0	0	0	0	10	10	10	10	10	100
9	1,00	1,54	0,40	10	10	10	10	10	100
11,7	1,10	2	0,48	10	10	10	10	10	100
15,21	1,21	2,6	0,56	10	10	10	10	10	100
19,77	1,32	3,38	0,64	8	8	7	7	7,5	75
25,7	1,43	4,4	0,73	7	2	7	3	4,75	47,5
33,42	1,54	5,72	0,83	1	2	2	1	1,5	15
43,44	1,65	7,43	0,93	0	1	1	2	1	10

Taula 4. Resultats de mortalitat 14 dies (*Eisenia fetida*).

Nº MORTS 14d	Control	9	11,7	15,21	19,77	25,7	33,42	43,44
Rèplica1	0	0	0	0	2	3	9	10
Rèplica2	0	0	0	0	2	8	8	9
Rèplica3	0	0	0	0	3	3	8	9
Rèplica4	0	0	0	0	3	7	9	8
Mitjana	0	0	0	0	2,5	5,25	8,5	9
% Mortalitat	0	0	0	0	25	52,5	85	90
Probits	-	-	-	-	4,33	5,08	6,04	6,28

Taula 5. Resultats del test de Dunnett per els valors de supervivència. Font: SPSS.

(I) Concentraci3n	(J) Concentraci3n	Diferencia de medias (I-J)	Error típic	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
9,00	,00	,00000	,71807	1,000	-2,0208	2,0208
11,70	,00	,00000	,71807	1,000	-2,0208	2,0208
15,21	,00	,00000	,71807	1,000	-2,0208	2,0208
19,77	,00	-2,50000(*)	,71807	,011	-4,5208	-,4792
25,70	,00	-5,25000(*)	,71807	,000	-7,2708	-3,2292
33,42	,00	-8,50000(*)	,71807	,000	-10,5208	-6,4792
43,44	,00	-9,00000(*)	,71807	,000	-11,0208	-6,9792

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Taula 6. Numero de descendents 56 dies (*Eisenia fetida*).

[mg/kg]	log conc.	R1	R2	R3	R4	nº petits	Desviació
0	0	57	54	56	53	55	1,83
0,78	0,25042	72	67	71	71	70,25	2,22
1,55	0,40654	45	62	83	77	66,75	16,98
3,1	0,612784	66	52	72	81	67,75	12,18
6,2	0,857332	65	41	42	39	46,75	12,23
12,4	1,127105	16	10	18	7	12,75	5,12

Taula 7. Resultats del test de Dunnett per els valors de numero de juvenils.
Font: SPSS.

(I) Concentraci3n	(J) Concentraci3n	Diferencia de medias (I-J)	Error t3pico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					L3mite superior	L3mite inferior
,78	,00	15,25000	7,19133	,168	-4,6082	35,1082
1,55	,00	11,75000	7,19133	,370	-8,1082	31,6082
3,10	,00	12,75000	7,19133	,300	-7,1082	32,6082
6,20	,00	-8,25000	7,19133	,678	-28,1082	11,6082
12,40	,00	-42,25000(*)	7,19133	,000	-62,1082	-22,3918

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los dem3s grupos.

Taula 8. Pesos assaig de toxicitat cr3nica (*Eisenia fetida*).

[mg/kg]	Pes i	Pes f	N3 vius f	Pes i cucs	Pes f cucs	Dif pes (g)	Dif pes (mg)
C	4,6328	3,761	10	0,46328	0,3761	0,087	87,18
C	4,8025	4,2653	10	0,48025	0,42653	0,054	53,72
C	4,6927	3,7606	9	0,46927	0,41784444	0,051	51,43
C	4,5297	4,2411	10	0,45297	0,42411	0,029	28,86
0,78	4,903	4,2401	10	0,4903	0,42401	0,066	66,29
0,78	4,9306	4,6435	10	0,49306	0,46435	0,029	28,71
0,78	4,308	3,8292	9	0,4308	0,42546667	0,005	5,33
0,78	4,6229	4,44	10	0,46229	0,444	0,018	18,29
1,55	4,3969	4,1498	10	0,43969	0,41498	0,025	24,71
1,55	4,9336	3,9051	9	0,49336	0,4339	0,059	59,46
1,55	4,083	3,8246	10	0,4083	0,38246	0,026	25,84
1,55	4,072	3,9478	10	0,4072	0,39478	0,012	12,42
3,1	4,1299	3,951	10	0,41299	0,3951	0,018	17,89
3,1	5,0273	4,2418	9	0,50273	0,47131111	0,031	31,42
3,1	4,6249	4,4656	10	0,46249	0,44656	0,016	15,93
3,1	4,5731	4,5267	10	0,45731	0,45267	0,005	4,64
6,2	4,5004	3,762	9	0,45004	0,418	0,032	32,04
6,2	4,5336	3,6526	9	0,45336	0,40584444	0,048	47,52
6,2	4,7239	4,2357	10	0,47239	0,42357	0,049	48,82
6,2	5,0941	3,7834	9	0,50941	0,42037778	0,089	89,03
12,4	4,5174	3,4574	10	0,45174	0,34574	0,106	106,00
12,4	4,2678	3,1094	10	0,42678	0,31094	0,116	115,84
12,4	4,1994	2,884	9	0,41994	0,32044444	0,099	99,50
12,4	4,6178	2,9158	10	0,46178	0,29158	0,170	170,20

Taula 9. Promig i desviació per la diferència de pes en l'assaig de toxicitat crònica (*Eisenia fetida*).

[mg/kg]	X Dif. Pes (mg)	Desviació
C	0,055	24,034
0,78	0,030	26,228
1,55	0,031	20,172
3,1	0,017	10,981
6,2	0,054	24,344
12,4	0,123	32,252

Taula 10. Resultats del test de Dunnett per els valors de diferència de pes.
Font: SPSS.

(I) Concentraci3n	(J) Concentraci3n	Diferencia de medias (I-J)	Error t3pico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					L3mite superior	L3mite inferior
,78	,00	-25,64250	16,89614	,436	-72,2997	21,0147
1,55	,00	-24,69000	16,89614	,471	-71,3472	21,9672
3,10	,00	-37,82750	16,89614	,136	-84,4847	8,8297
6,20	,00	-,94500	16,89614	1,000	-47,6022	45,7122
12,40	,00	67,58750(*)	16,89614	,004	20,9303	114,2447

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los dem3s grupos.

Taula 11. Exemple dels c3lculs realitzats per a la determinaci3n de l'activitat de l'AChE.

absprot	[mg/ml] prote3na	[mg/ml] prote3na real	Absorb3ncia Ellman (absAChE)	Δ Abs/min	Activitat (nmols/mg*min)
Valor d'absorb3ncia determinaci3n prote3na	$=(\text{absprot} - 0.0279) / 0.784$	$=[\text{mg/ml}] \text{ prote3na} * \text{F.D}$	Valor d'absorb3ncia determinaci3n AChE	$=\text{absAChE} / \text{minuts}$	$=0.000574 * ((\Delta \text{Abs} / \text{min}) / ([\text{mg/ml}] \text{ prote3na real})) * 1000000$

Recta absorb3ncia - prote3na: $y = 0,784 * x + 0,0279$

$\text{abs} = 0.784 * [\text{mg/ml}] + 0.0279$

F.D: factor de diluci3n, que 3s 10 en tots els casos.

Minuts: minuts de mesura de l'increment, que s3n 10 per totes les lectures.

Taula 12. Resultats del test de Dunnett per els valors de l'activitat de l'enzim AChE. Font: SPSS.

(I) concentració	(J) concentració	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
,78	,00	1,63163	1,08580	,435	-1,2532	4,5165
1,55	,00	,97638	1,08580	,836	-1,9084	3,8612
3,10	,00	-1,34735	1,08580	,610	-4,2322	1,5375
6,20	,00	-1,22937	1,08580	,685	-4,1142	1,6555
12,40	,00	-1,94155	1,08580	,279	-4,8264	,9433

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Taula 13. Resultats de supervivència a 48 hores (*Daphnia magna*).

[mg7kg sòl]	C (ASTM)	0	0,78	1,55	3,1	6,2	12,42
Rèplica1	5	5	5	5	5	5	5
Rèplica2	5	5	5	5	5	5	5
Rèplica3	5	5	5	5	5	5	5
Rèplica4	5	5	5	5	5	5	4
TOTAL	20	20	20	20	20	20	19
% Supervivència	100	100	100	100	100	100	95
Desviació	0	0	0	0	0	0	0,5

Taula 14. Numero total de nounats a 21 dies per dàfnia.

Concentració	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Promig	Desviació
0	36	32	33	38	42	23	33	30	33	51	35,1	7,49
0,78	31	31	32	29	21	30	17	27	28	33	27,9	5,11
1,55	20	25	27	21	27	31	30	14	33	30	25,8	5,90
3,1	30	29	45	38	40	32	35	35	38	14	33,6	8,40
6,2	8	31	19	30	37	31	25	34	35	26	27,6	8,69
12,4	26	36	32	38	30	42	31	39	36	35	34,5	4,77

Taula 15. Resultats del test de Dunnett per el numero de nounats per dàfnia.
Font: SPSS.

(I) concentració	(J) concentració	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
,78	,00	-7,20000	3,08683	,091	-15,1968	,7968
1,55	,00	-9,30000(*)	3,08683	,017	-17,2968	-1,3032
3,10	,00	-1,50000	3,08683	,985	-9,4968	6,4968
6,20	,00	-7,50000	3,08683	,073	-15,4968	,4968
12,40	,00	-,60000	3,08683	1,000	-8,5968	7,3968

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Taula 16. Dia de la primera posta per dàfnia.

Concentració	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Promig	Desviació
0	10	10	10	10	10	14	10	10	10	10	10,4	1,26
0,78	10	10	10	10	11	11	11	10	10	10	10,3	0,48
1,55	12	10	11	11	11	10	10	13	10	11	10,9	0,99
3,1	10	11	11	11	10	11	11	11	11	18	11,5	2,32
6,2	13	10	10	10	10	10	10	11	10	10	10,4	0,97
12,4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0,00

Taula 17. Mida de la primera posta per dàfnia.

Concentració	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Promig	Desviació
0	10	9	10	10	11	8	6	9	10	12	9,5	1,65
0,78	8	6	8	6	5	7	5	5	10	7	6,7	1,64
1,55	7	8	6	10	6	6	6	8	6	8	7,1	1,37
3,1	6	7	12	6	9	10	8	6	10	14	8,8	2,74
6,2	6	8	7	4	8	7	10	10	11	12	8,3	2,45
12,4	7	7	7	8	6	10	10	11	9	7	8,2	1,69

Taula 18. Numero total de postes per dàfnia.

Concentració	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Promig	Desviació
0	5	5	4	4	5	5	4	4	4	6	4,6	0,70
0,78	5	5	5	5	4	5	4	5	4	5	4,7	0,48
1,55	5	5	4	4	4	5	5	4	5	6	4,7	0,67
3,1	5	5	5	6	5	4	5	5	5	1	4,6	1,35
6,2	2	5	5	6	5	4	4	5	5	3	4,4	1,17
12,4	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4,8	0,42

Taula 19. Resultats del test de Dunnett per la taxa de creixement de *S. capricornutum* respecte control amb medi. Font: SPSS.

(I) concentració	(J) concentració	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
,10	,00	-,74964(*)	,03616	,000	-,8550	-,6443
,78	,00	-,59569(*)	,03616	,000	-,7010	-,4904
1,55	,00	-,78120(*)	,03616	,000	-,8865	-,6759
3,10	,00	-,48995(*)	,03616	,000	-,5953	-,3846
6,20	,00	-,69379(*)	,03616	,000	-,7991	-,5885
12,40	,00	-,72520(*)	,03616	,000	-,8305	-,6199

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Taula 20. Resultats del test de Dunnett per la taxa de creixement de *S. capricornutum* respecte control del sòl. Font: SPSS.

(I) concentració	(J) concentració	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite superior	Límite inferior
,78	,10	,15395(*)	,03881	,008	,0413	,2666
1,55	,10	-,03156	,03881	,878	-,1442	,0811
3,10	,10	,25970(*)	,03881	,000	,1471	,3723
6,20	,10	,05585	,03881	,495	-,0568	,1685
12,40	,10	,02444	,03881	,951	-,0882	,1371

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Figura 1. Gràfic logarítmic de l'anàlisi probit obtingut amb el programa Statistica per a la supervivència 14 dies d'*Eisenia fetida*. Valors mg Confidor/kg.

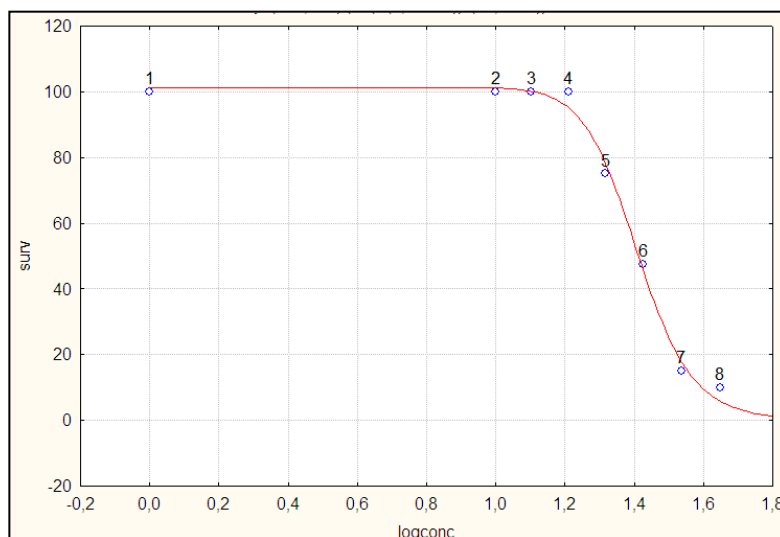


Figura 2. Gràfic logarítmic de l'anàlisi probit obtingut amb el programa Statistica per a la supervivència 14 dies d'*Eisenia fetida*. Valors mg IMI/kg.

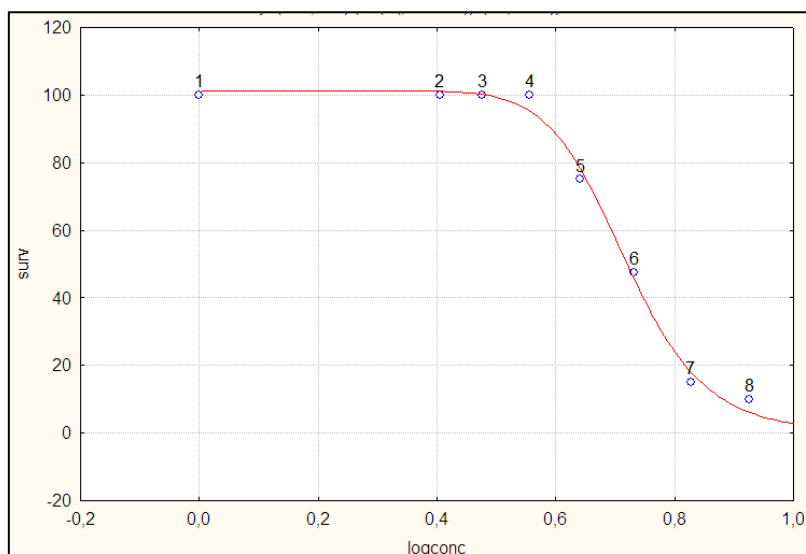


Figura 3. Gràfic hormètic de l'anàlisi probit obtingut amb el programa Statistica per a la reproducció a 56 dies d'*Eisenia fetida*.

